

Mechanistische Untersuchungen zum Einfluss von Estrogenen und Gestagenen auf die Atherothrombose

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät
Biologie und Geografie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Till Freudenberger
aus Düsseldorf

April 2010

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Pharmakologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. J.W. Fischer

2. Gutachter: Frau Prof. Dr. V. Jendrossek

3. Gutachter: Frau Prof. Dr. A. Vortkamp

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Frau Prof. Dr. E. Winterhager

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 2010

**Es kann passieren, dass man hinfällt.
Unverzeihlich ist nur, wenn man liegen bleibt.
(Winston Churchill)**

Meinen Eltern

Meinen Geschwistern

Meiner Freundin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	vii
Abbildungsverzeichnis	x
Tabellenverzeichnis	xiii
1. Einleitung	1
1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen	2
1.1.1 Eine Definition	2
1.1.2 Epidemiologie	2
1.2 Arterielle Blutgefäße	3
1.2.1 Aufbau und Funktion der Blutgefäße	3
1.2.2 Das Endothel und Stickstoffmonoxid (NO)	4
1.3 Atherosklerose	5
1.3.1 Definition der Atherosklerose	5
1.3.2 Pathogenese der Atherosklerose	6
1.3.3 Von der Atherosklerose zur Thrombose – Plaqueinstabilität	7
1.4 Extrazelluläre Matrix	9
1.4.1 Bestandteile und Funktionen der extrazellulären Matrix	9
1.4.2 Hyaluronsäure	10
1.4.2.1 Aufbau und Funktionen	10
1.4.2.2 Synthese	11
1.4.2.3 Enzymatische Degradation	12
1.4.3 Hyaladherine	13
1.4.4 HA-Rezeptoren	13
1.4.5 Hyaluronsäure bei Atherosklerose und Thrombose	14
1.5 Thrombose	15
1.5.1 Die Gerinnungskaskade	15
1.5.2 Plaqueruptur vs. Plaqueerosion	17
1.6 Hormone in Atherosklerose und Thrombose	18
1.6.1 Epidemiologische Erkenntnisse	18
1.6.2 Zellbiologische Untersuchungen	19
1.6.3 Schlussfolgerungen aus Experimenten an Tiermodellen	20
1.6.4 Paradoxon – Protektion vs. Destruktion	20
1.6.4.1 Die Rolle von Gestagenen	20

1.6.4.2 Medroxyprogesteronacetat (MPA)	21
1.7 Das Tiermodell „Maus“ und seine Bedeutung für Atherosklerose und Thrombose	22
1.7.1 Die ApoE-defiziente Maus	23
1.7.2 Mausmodelle der Thrombose	24
1.7.2.1 Eisen(III)-chlorid-Modell der arteriellen Thrombose	24
1.7.2.2 Photochemisch induzierte, arterielle Thrombose	24
2. Zielsetzung	26
3. Material und Methoden	28
3.1 Tierversuche	29
3.1.1 Versuchstiere	29
3.1.2 Versuchsgruppen und -durchführung	29
3.1.3 Operative Entfernung der Eierstöcke (Ovariectomie)	30
3.1.4 Subkutane Implantation hormonfreisetzender Pellets	31
3.1.5 Lipidprofil	31
3.1.5.1 Gewinnung von plättchenarmem Plasma (PPP)	31
3.1.5.2 Bestimmung des Lipidprofils im Plasma	32
3.1.6 Photochemisch induziertes laserbasiertes Thrombosemodell	32
3.1.6.1 Katheterisierung der Maus	32
3.1.6.2 Platzieren der Flusssonde und Einstellen des Lasers	33
3.1.6.3 Die Messung	34
3.1.6.4 Auswertung der Flussmessung	35
3.1.7 FACS (fluorescent activated cell sorting) und ETP (endogenes Thrombinpotential)	36
3.1.7.1 Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP) zur Bestimmung der Plättchenaktivierung im FACS und von plättchenarmem Plasma (PPP) zur Bestimmung des ETPs	36
3.1.7.2 FACS (fluorescent activated cell sorting)	36
3.1.7.3 Bestimmung der Plättchenaktivierung im FACS	37
3.1.7.4 Evaluation des endogenen Thrombinpotentials	37
3.1.8 Ausmaß der Atherosklerose und (Immun)histochemie	38
3.1.8.1 Perfusion und Entnahme von Aorta und Herz	38
3.1.8.2 Öl-Rot-O-Färbung von Lipidablagerungen in Aorten	39
3.1.8.3 Bestimmung des Plaquescores	40

3.1.9 Plaquemorphologie – (Immun)histochemie	40
3.1.9.1 Kryokonservierung von Herzen und Anfertigung von Gefrierschnitten	40
3.1.9.2 (Immun)histochemische Analyse von Gefrierschnitten des Aortenursprungs	41
3.1.9.3 Dokumentation und quantitative Analyse der immunhistochemischen Färbungen	42
3.1.10 Analyse der Endothelfunktion	43
3.1.10.1 Entnahme der Aorta	43
3.1.10.2 Untersuchung isolierter Aortenringe im Organbad	43
3.1.10.3 Anfertigung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven	47
3.2 Zellversuche	48
3.2.1 Zellkultur	48
3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
3.2.3 Western-Blot	49
3.2.4 Immunzytochemie	50
3.2.5 Gesamt-RNA-Isolation aus Zellen und Messung der RNA-Konzentration	50
3.2.6 cDNA – Reverse Transkription	51
3.2.7 realtime RT quantitative PCR (qPCR)	51
3.2.8 Proliferation	52
3.2.9 Proteinbestimmung	52
3.2.10 HA-Größenausschlußchromatographie	52
3.2.11 Lentiviren	53
3.2.11.1 Plasmid-Vektor-Konstruktion	53
3.2.11.2 Virenproduktion	54
3.2.11.3 Infektion von VSMC	55
3.3 Statistik	55
4. Ergebnisse	56
4.1 Tierversuche	57
4.1.1 Effekte von endogenen ovariellen Steroiden und exogen substituiertem Estradiol auf die Atherosklerose im Tiermodell	57
4.1.1.1 Atherosklerose nach Substitution von 6,6 µg E ₂ /Tag	57
4.1.1.2 Substitution von 1,1µg E ₂ /Tag	58

4.1.1.2.1 Bestimmung der Uterusgewichte und Estradiol-Plasmaspiegel	58
4.1.1.2.2 Bestimmung der Körpergewichte und des Lipidprofils	59
4.1.1.2.3 Atherosklerose	60
4.1.1.2.4 Endothelfunktion	61
4.1.1.2.5 Plaquemorphologie	64
4.1.1.2.5.1 Lipidgehalt atherosklerotischer Plaques des Aortenursprungs	64
4.1.1.2.5.2 Kollagengehalt und -packungsdichte, Makrophagen-Retention und Hyaluronsäure-Akkumulation	65
4.1.1.2.5.3 Gehalt α -SM-Aktin positiver Zellen	67
4.1.1.2.6 Evaluation der Thrombusbildung	68
4.1.2 Effekte von Estrogen/Gestagen-Kombinationen auf die Atherothrombose im Tiermodell	70
4.1.2.1 Bestimmung der Uterusgewichte	70
4.1.2.2 Bestimmung der Körpergewichte und des Lipidprofils	71
4.1.2.3 Evaluation der Thrombusbildung	72
4.1.2.4 Evaluation der Plättchenaktivierung und Thrombinbildung	73
4.1.2.4.1 Basale und induzierte P-Selektin (CD62P)-Expression auf Plättchen	73
4.1.2.4.2 Endogenes Thrombinpotential in plättchenarmem Plasma	74
4.1.2.5 Ausmaß der Atherosklerose	75
4.1.2.6 Endothelfunktion	75
4.1.2.7 Plaquemorphologie	77
4.1.2.7.1 Lipidgehalt atherosklerotischer Plaques des Aortenursprungs	77
4.1.2.7.2 SMC-Invasion, Makrophagen-Retention und Hyaluronsäure-Akkumulation	77
4.2 Effekte von Estradiol auf humane, glatte Gefäßmuskelzellen	79

4.2.1 Proliferative Kapazität	79
4.2.2 Regulation der extrazellulär regulierten Kinase (ERK)	80
4.2.3 Hyaluronsäure-Sekretion und relative Molekulargewichtsverteilung	81
4.2.4 Immunzytochemie	82
4.2.5 Hyaluronsäuresynthase mRNA-Expression	83
4.2.6 <i>in silico</i> Analyse der HAS1- und HAS2-Promotorregionen	84
4.2.7 Estrogenrezeptor-Abhängigkeit	85
4.2.8 Lentivirale Überexpression von HAS1 und HAS2	85
4.2.8.1 Proliferation	86
4.2.8.2 Regulation der extrazellulär regulierten Kinase (ERK)	87
5. Diskussion	91
5.1 Tierversuche	92
5.1.1 Effekte von endogenen ovariellen Steroiden und exogen substituiertem Estradiol auf die Atherosklerose im Tiermodell	92
5.1.1.1 Atherosklerose nach Substitution von 6,6 µg E ₂ /Tag	93
5.1.1.2 Substitution von 1,1 µg E ₂ /Tag	93
5.1.1.2.1 Bestimmung der Uterusgewichte und Estradiol-Plasmaspiegel	93
5.1.1.2.2 Bestimmung der Körpergewichte und des Lipidprofils	94
5.1.1.2.3 Atherosklerose	95
5.1.1.2.4 Endothelfunktion	96
5.1.1.2.5 Plaquemorphologie	98
5.1.1.2.5.1 Lipidgehalt atherosklerotischer Plaques des Aortenursprungs	99
5.1.1.2.5.2 Kollagengehalt und -packungsdichte, Makrophagen-Retention und Hyaluronsäure- Akkumulation	99
5.1.1.2.5.3 Gehalt α-SM-Aktin positiver Zellen	100
5.1.1.2.6 Evaluation der Thrombusbildung	100
5.1.2 Effekte von Estrogen/Gestagen-Kombinationen auf die Atherothrombose im Tiermodell	101
5.1.2.1 Bestimmung der Uterusgewichte	101

5.1.2.2 Bestimmung der Körpergewichte und des Lipidprofils	102
5.1.2.3 Evaluation der Thrombusbildung	102
5.1.2.4 Evaluation der Plättchenaktivierung und Thrombinbildung	102
5.1.2.4.1 Basale und induzierte P-Selektin (CD62P)-Expression auf Plättchen	102
5.1.2.4.2 Endogenes Thrombinpotential in plättchenarmem Plasma	103
5.1.2.5 Ausmaß der Atherosklerose	104
5.1.2.6 Endothelfunktion	104
5.1.2.7 Plaquemorphologie	105
5.1.2.7.1 Lipidgehalt atherosklerotischer Plaques des Aortenursprungs	105
5.1.2.7.2 SMC-Gehalt, Makrophagen-Retention und Hyaluronsäure-Akkumulation	106
5.1.2.8 Matrix-Pharmakologie	107
5.1.3 Resumée	109
5.1.4 Ausblick	110
5.2 Zellversuche	112
5.2.1 Effekte von Estradiol auf humane, glatte Gefäßmuskelzellen	112
5.2.2 Estrogenrezeptorabhängigkeit und <i>in silico</i> Analyse	116
5.2.3 Lentivirale Überexpression von HAS1 und HAS2	117
6. Zusammenfassung	120
7. Referenzen	124
8. Appendizes	157
8.1 Appendix 1	158
8.2 Appendix 2	160
8.3 Appendix 3	161
9. Danksagung	162
10. Publikationsverzeichnis	164
11. Ausgewählte Originalarbeiten	169
12. Lebenslauf	188
13. Eidesstattliche Erklärung	193

Abkürzungsverzeichnis

23G	23 Gauge
27G	27 Gauge
ACh	Acetylcholin
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ApoE	Apolipoprotein E
AUC	<i>area under curve</i> (Fläche unter der Kurve)
cm	Zentimeter
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (bovines Serumalbumin)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CEE	<i>conjugated equine estrogens</i> (konjugierte Pferdeestrogene)
cGMP	<i>cyclic guanosin monophosphate</i> (zyklisches Guanosinmonophosphat)
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat)
CMV	Cytomegalievirus
COX	Cyclooxygenase
CS	Chondroitinsulfat
DAG	Diacylglycerol
dl	Deziliter
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DS	Dermatansulfat
E ₂	17- β -Estradiol
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
ERT	<i>estrogen replacement therapy</i> (Estrogensersatztherapie)
EtOH	Ethanol
ETP	endogenes Thrombinpotential
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>fluorescent activated cell sorting</i>
FAK	fokale Adhäsionskinase
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykane
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)

H	Heparin
HA	<i>hyaluronic acid</i> (Hyaluronsäure)
HABP	<i>hyaluronic acid binding protein</i> (Hyaluronsäure-Binde-Protein)
HAS	<i>hyaluronic acid synthase</i> (Hyaluronsäuresynthase)
HERS	<i>Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study</i>
HMW	<i>high molecular weight</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> (humanes Immundefizienzvirus)
HK	<i>high molecular weight kininogen</i> (hochmolekulares Kininogen)
HRT	<i>hormone replacement therapy</i> (Hormonersatztherapie)
HS	Heparansulfat
Hyal	Hyaluronidase
ICAMs	<i>intercellular adhesion molecules</i> (interzelluläre Adhäsionsmoleküle)
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
i.p.	intraperitoneal
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzerkrankung
KS	Keratansulfat
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPL	Plasmalipoproteinlipase
M	molar
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MI	Myokardinfarkt
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
MPA	Medroxyprogesteronacetat
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
ng	Nanogramm
NIH	<i>National Institute of Health</i>
nm	Nanometer
NO	<i>nitric oxide</i> (Stickstoffmonoxid)
NOS	NO-Synthase
NSAIDs	<i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>
O ₂ ^{•-}	Superoxidradikal

OONO ⁻	Peroxynitrit
OVX	Ovariectomie
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (mit Phosphat gepufferte Saline)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF-BB	<i>platelet derived growth factor-BB</i>
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PKG	ProteinkinaseG
pM	pikomolar
PMT	photomultiplier tubes (Photovervielfältigerröhren)
PPP	<i>platelet-poor plasma</i> (plättchenarmes Plasma)
PRP	<i>platelet-rich plasma</i> (plättchenreiches Plasma)
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> (quantitative Polymerase-Kettenreaktion)
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s.c.	subkutan
SSC	<i>Side Scatter</i> (Seitenstreulicht)
sGC	<i>soluble guanylyl cyclase</i> (lösliche Guanylatzyklase)
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin
TBS	<i>tris buffered saline</i> (mit Tris gepufferte Saline)
TBST	<i>tris buffered saline with Tween-20</i> (mit Tris gepufferte Saline mit Tween-20)
TF	<i>tissue factor</i> (Gewebsfaktor)
TSG-6	Tumor-Nekrose-Faktor stimuliertes Gen 6
UDP	Uridindiphosphat
V	Volt
VCAMs	<i>vascular adhesion molecules</i> (vaskuläre Zell-Adhäsionsmoleküle)
VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i> (glatte Gefäßmuskelzellen)
VSV-G	Hüllprotein
WHI	<i>world health initiative</i>
WHO	<i>world health organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Verteilung der weltweiten Gesamtmortalität verschiedener Krankheitsgruppen im Jahr 2005	2
Abbildung 1-2: Aufbau eines arteriellen Blutgefäßes	3
Abbildung 1-3: Molekulare Mechanismen der durch NO vermittelten Vasorelaxation	5
Abbildung 1-4: Plaque(in)stabilität und ihre Folgen	8
Abbildung 1-5: Aufbau von Hyaluronsäure	11
Abbildung 1-6: Mechanismen der Thrombose	17
Abbildung 1-7: Plaqueruptur und Plaqueerosion	18
Abbildung 1-8: Strukturformel von Medroxyprogesteronacetat (MPA)	22
Abbildung 1-9: Zusammenfassung der Rolle von ApoE bei der Clearance von Chylomikron-Resten und VLDL aus der Zirkulation	23
Abbildung 3-1: Experimentelles Design	30
Abbildung 3-2: Legen eines Venenverweilkatheters und Präparation der <i>arteria carotis communis</i>	33
Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des Prinzips der Ultraschall-Flusssonde	34
Abbildung 3-4: Aufbau des photochemisch induzierten laserbasierten Thrombosemodells	35
Abbildung 3-5: Exemplarisches Thrombogramm	38
Abbildung 3-6: <i>en face</i> -Präparation von Aorten	39
Abbildung 3-7: Mit Hämalaun-Eosin (H&E) gefärbter Longitudinal-Schnitt durch ein Mäuseherz (links), mit H&E gefärbter Transversal-Schnitt durch ein Mäuseherz im Aortenursprung (rechts)	41
Abbildung 3-8: Schematische Darstellung eines Organbades (großes Bild), Aortenring im Organbad mit Mikrometerschraube (kleines Bild)	45
Abbildung 3-9: Originalmessung von zwei Aortenringen (rot und schwarz) im Organbad	47
Abbildung 3-10: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Western-Blot-Apparatur	49
Abbildung 4-1: Ausmaß der Atherosklerose nach 6,6 µg E ₂ /Tag	57
Abbildung 4-2: Uterusgewicht (Nassgewicht) nach OVX und E ₂ -Substitution	58
Abbildung 4-3: Ausmaß der Atherosklerose nach 1,1 µg E ₂ /Tag	61

Abbildung 4-4: Durch ACh- und SNAP induzierte Vasorelaxation bei Kontrollen und ovariectomierten Tieren	62
Abbildung 4-5: Durch ACh- und SNAP induzierte Vasorelaxation nach 1,1 µg E ₂ /Tag	63
Abbildung 4-6: Lipidakkumulation in atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs nach 1,1 µg E ₂ /Tag	64
Abbildung 4-7: Gesamtkollagengehalt und -packungsdichte nach 1,1 µg E ₂ /Tag	65
Abbildung 4-8: Makrophagen-Retention und Hyaluronsäure-Akkumulation nach 1,1 µg E ₂ /Tag	66
Abbildung 4-9: SMC-Gehalt nach 1,1 µg E ₂ /Tag	67
Abbildung 4-10: Validierung des Modells der photochemisch induzierten Thrombose	68
Abbildung 4-11: Zirkadiane Rhythmik	69
Abbildung 4-12: Evaluation des thrombotischen Potentials nach Ovariectomie und E ₂ -Substitution	69
Abbildung 4-13: Uterusgewicht (Nassgewicht) nach MPA- und MPA/E ₂ -Substitution	71
Abbildung 4-14: Evaluation des thrombotischen Potentials unter Behandlung mit MPA und E ₂	72
Abbildung 4-15: FACS-Analyse der CD62P Expression nach MPA- und MPA/E ₂ -Substitution	73
Abbildung 4-16: Endogenes Thrombinpotential (ETP) nach MPA- und MPA/E ₂ -Substitution	74
Abbildung 4-17: Ausmaß der Atherosklerose nach MPA- und MPA/E ₂ -Substitution	75
Abbildung 4-18: Endothelfunktion nach MPA- und MPA/E ₂ -Substitution	76
Abbildung 4-19: Lipidakkumulation in atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs nach MPA- und MPA/E ₂ -Substitution	77
Abbildung 4-20: SMC-Gehalt, Makrophagen-Retention und Hyaluronsäure-Akkumulation nach MPA- und MPA/E ₂ -Substitution	78
Abbildung 4-21: DNA-Synthese von VSMC nach E ₂ -Stimulation	80
Abbildung 4-22: ERK-Phosphorylierung bei VSMC nach E ₂ -Stimulation	80

Abbildung 4-23: Hyaluronsäure-Sekretion in das Medium von VSMC, die mit PDGF alleine oder in Kombination mit E ₂ stimuliert worden sind	81
Abbildung 4-24: HA-Größenausschlusschromatographie von VSMC, die mit PDGF alleine oder in Kombination mit E ₂ stimuliert worden sind	82
Abbildung 4-25: Immunzytochemie von VSMC für HA (grün) und Zellkerne (blau)	82
Abbildung 4-26: HAS- und Hyal-mRNA-Expression von VSMC, die mit PDGF alleine oder in Kombination mit E ₂ stimuliert worden sind	83
Abbildung 4-27: HA-Rezeptor- und Hyaladherin-mRNA-Expression von VSMC, die mit PDGF alleine oder in Kombination mit E ₂ stimuliert worden sind	84
Abbildung 4-28: HAS-mRNA-Expression von VSMC, die nach Vorinkubation mit IC182780 mit PDGF alleine oder in Kombination mit E ₂ stimuliert worden sind	85
Abbildung 4-29: Hyaluronsäure-Sekretion in das Medium von VSMC, die mit Viren transduziert wurden, die entweder das Kontrollplasmid pCI1 trugen oder Plasmide zur Überexpression von HAS1 (oeHAS1) oder HAS2 (oeHAS2)	86
Abbildung 4-30: DNA-Synthese von VSMC nach Überexpression von HAS1 und HAS2 und nachfolgender Stimulation mit E ₂	87
Abbildung 4-31: ERK-Phosphorylierung bei VSMC nach Überexpression von HAS1 und nachfolgender Stimulation mit E ₂	88
Abbildung 4-32: ERK-Phosphorylierung bei VSMC nach Überexpression von HAS2 und nachfolgender Stimulation mit E ₂	89
Abbildung 5-1: Schematische Darstellung der Wirkungen von E ₂ und MPA auf Atherosklerose und Thrombose im Tiermodell <i>in vivo</i>	110
Abbildung 5-2: Schematische Darstellung der Wirkung von Estradiol auf das HA-System von VSMC <i>in vitro</i>	118

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Einteilung der Glykosaminoglykane basierend auf ihren Disaccharideinheiten und den Verknüpfungen zwischen den Disaccharideinheiten	10
Tabelle 3-1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel	48
Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Körpergewichte und des Lipidprofils nach OVX und E ₂ -Substitution	60
Tabelle 4-2: Zusammenfassung der Körpergewichte und des Lipidprofils nach MPA- und MPA/E ₂ -Substitution	71

1. *Einleitung*

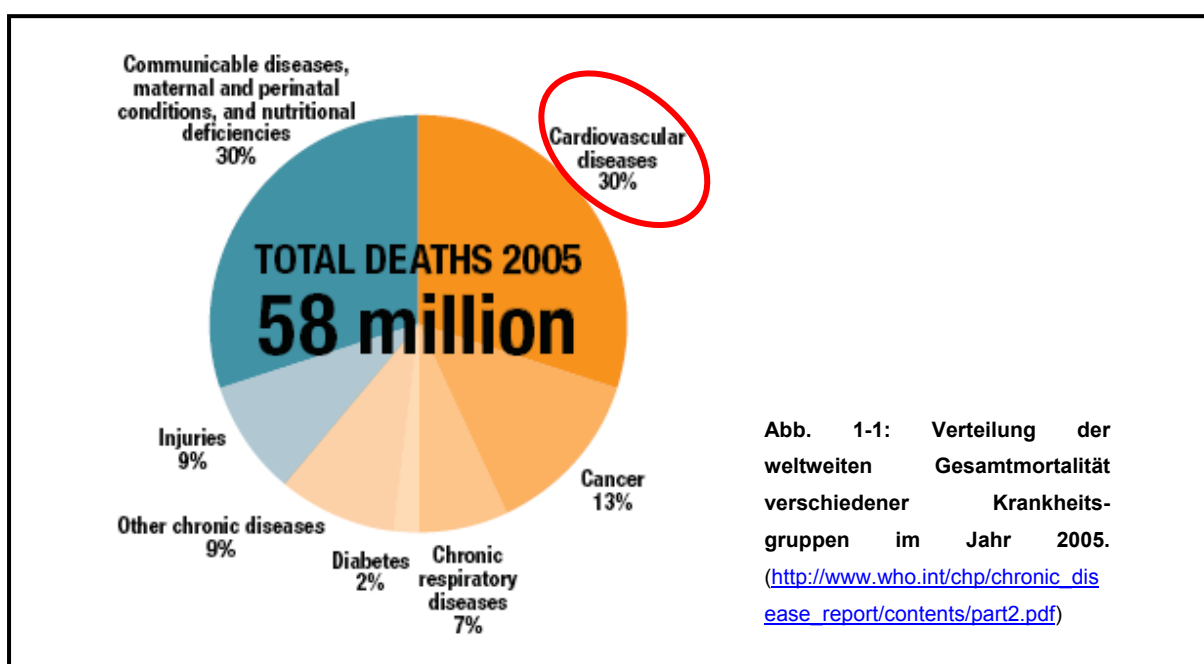
1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

1.1.1 Eine Definition

Die Weltgesundheitsorganisation WHO definiert kardiovaskuläre Erkrankungen als eine Gruppe von Funktionsstörungen des Herzens und der Blutgefäße. Sie treten in verschiedenen Manifestationsformen, wie z.B. der koronaren Herzerkrankung, zerebrovaskulären Erkrankungen, peripheren arteriellen Erkrankungen oder kongenitalen Herzerkrankungen ebenso wie tiefen Beinvenen-Thrombosen und Lungenembolien auf.

1.1.2 Epidemiologie

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen weltweit die häufigste Todesursache dar. In den westlichen Industrienationen repräsentieren sie trotz der aus den epidemiologischen Erkenntnissen des letzten Jahrzehnts abgeleiteten Therapieempfehlungen noch immer die Haupttodesursache in der Bevölkerung. Weltweit starben 2005 laut WHO 17 Millionen Menschen an den Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen. Diese Todesfälle repräsentieren 30 % der globalen Gesamt mortalität (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>). Allein in Deutschland standen im Jahr 2005 die Herz-Kreislauf-erkrankungen mit 830.277 Todesfällen an erster Stelle der Todesursachenstatistik (<http://www.g-i-s-a.de/res.php?id=609>).



Zu den Ursachen für kardiovaskuläre Erkrankungen zählen Fehlernährung, physische Inaktivität und Rauchen. Aus diesen „änderbaren“ Risiken resultieren bei chronischem Fehlverhalten erhöhter Blutdruck, erhöhte Blutglukose-Spiegel, erhöhte Blutfett-Werte, Übergewicht und Fettleibigkeit (Corti *et al.*, 2004). Mehr als 80 % der Todesfälle aufgrund koronarer oder zerebrovaskulärer Erkrankungen sind diesen Risiken zuzuschreiben. Darüber hinaus werden auch sozioökonomische Determinanten als Ursachen diskutiert, weil chronische Erkrankungen häufig auch eine Reflektion starker Zwänge wie Globalisierung, Urbanisierung und Altern der Bevölkerung sind; auch Armut und Stress zählen hierzu.

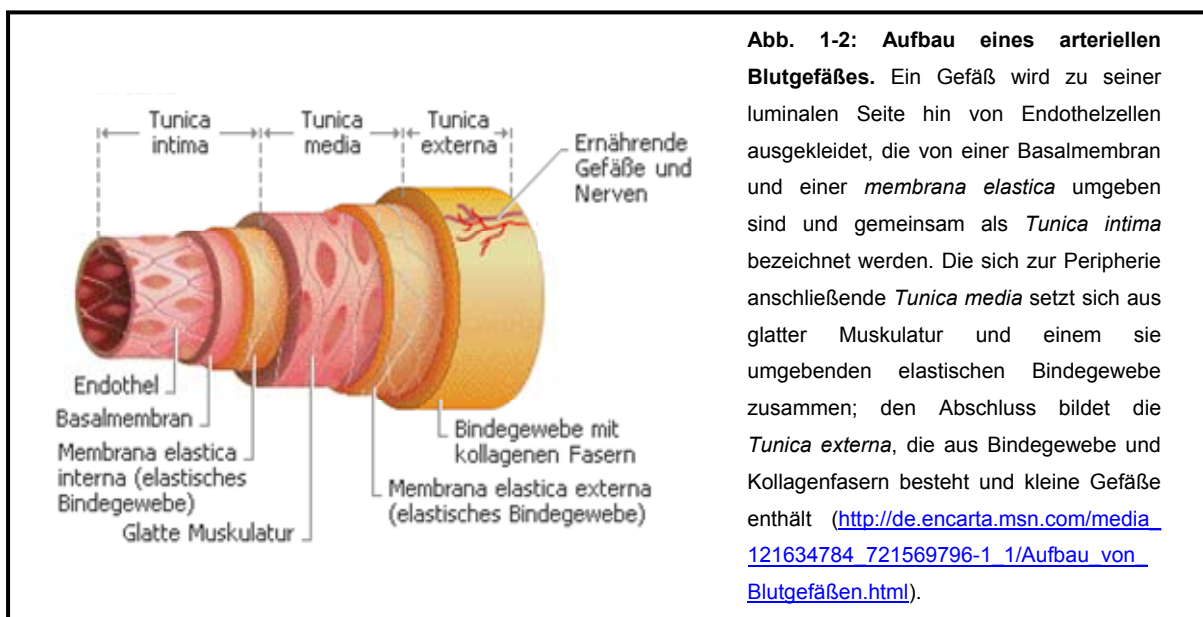
Prospektiv werden 2030 geschätzte 23,6 Millionen Menschen an den Folgen kardiovaskulärer Ereignisse – vor allen Dingen an der koronaren Herzerkrankung und Schlaganfällen – versterben (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>), was die Gruppe dieser Erkrankungen nicht nur retrospektiv, sondern auch in Zukunft zur häufigsten Todesursache macht.

1.2 Arterielle Blutgefäße

1.2.1 Aufbau und Funktion der Blutgefäße

Die Ätiologie kardiovaskulärer Erkrankungen ist vor allen Dingen auf Veränderungen in Aufbau und Funktion von Blutgefäßen zurückzuführen.

Blutgefäße des Menschen sind von innen nach außen dreigliedrig aufgebaut und setzen sich aus der *Tunica intima*, der *Tunica media* und der *Tunica externa* zusammen.

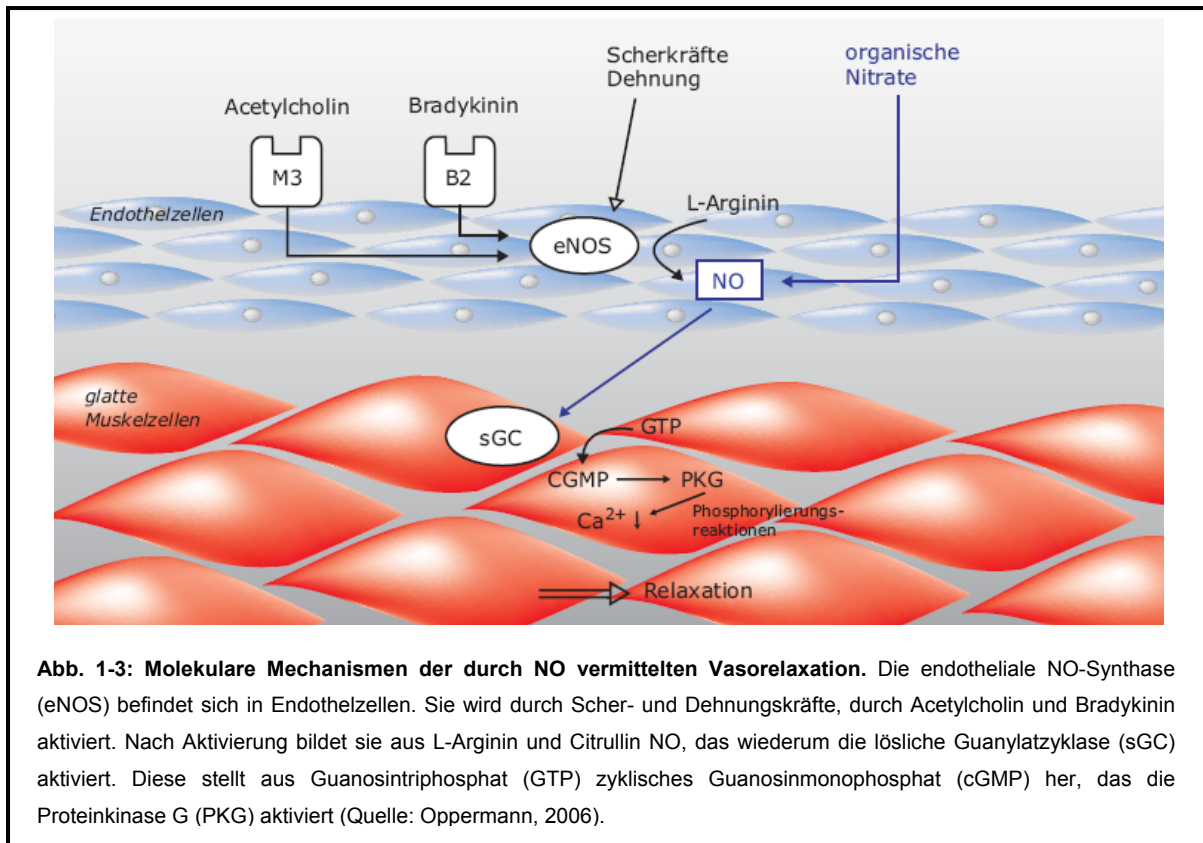


Die *Tunica intima* besteht aus einer einzelligen Schicht von Endothelzellen, die von einer subendothelialen Basalmembran und elastischem Bindegewebe umgeben ist (Kojda G, 2002; Alberts B, 2002). Das Endothel ist das größte endokrine Organ des menschlichen Körpers und kann bei einem Erwachsenen eine Fläche von bis zu 350 m² einnehmen (Pries *et al.*, 2000). Die Gesamtzahl von Endothelzellen im menschlichen Blutgefäßsystem wird auf 10¹¹ geschätzt (Sporn & Huber, 2001). Die Endothelzellen grenzen zur luminalen Seite hin die *Tunica media*, die aus mehreren Schichten ringförmig angelegter, glatter Gefäßmuskelzellen und deren extrazellulärer Matrix (EZM) aufgebaut ist, von dem fließenden Blut ab. Die glatten Muskelzellen in der *Tunica media* beeinflussen den Gefäßradius über Relaxation und Kontraktion. Die den glatten Muskelzellen unterliegende *Tunica externa* (auch *Tunica adventitia*) besteht zum größten Teil aus Fibroblasten, enthält außerdem Bindegewebe, Kollagengitter und Gefäßwandnerven und stellt den Kontakt zum umliegenden Gewebe her (Alberts B, 2002; Gawaz *et al.*, 2005).

1.2.2 Das Endothel und Stickstoffmonoxid (NO)

Das Endothel hat aber in Form der Abschirmung der *Tunica media* vom fließenden Blut nicht nur strukturell-funktionelle Aufgaben, sondern produziert mit Stickstoffmonoxid (NO) einen wichtigen vasoaktiven Mediator. NO ist ein physiologisch wichtiges, körpereigenes Radikal (Ignarro *et al.*, 1999; Murad, 1996). Es wird durch NO-Synthasen (NOS) gebildet, die L-Arginin zu Citrullin und NO umsetzen (Palmer *et al.*, 1988). Im Körper sind verschiedene Isoformen der NO-Synthasen (neuronale, induzierbare und endotheliale NOS) mit verschiedenen Funktionen verbreitet. Die unterschiedlichen Synthasen regulieren z.B. den Vasotonus, die Thrombozytenaggregation oder die Erregungsübertragung im ZNS. Innerhalb des kardiovaskulären Systems ist die wichtigste NOS-Isoform die endotheliale NOS (eNOS). Sie kommt in den Endothelzellen, die das Gefäß von innen auskleiden, membrangebunden vor (Garcia-Cardena *et al.*, 1996). Bei intaktem Endothel werden endotheliale M3-Rezeptoren durch Acetylcholin aktiviert, was nachfolgend zu einer Aktivierung der eNOS führt. Von der eNOS gebildetes NO aktiviert die lösliche Guanylatzyklase (sGC), die aus Guanosintriphosphat (GTP) zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) als sekundären Botenstoff synthetisiert. cGMP aktiviert zwei spezifisch cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG I und PKG II), die durch Phosphorylierungsreaktionen die verschiedenen Effekte von NO vermitteln

(Mittal & Murad, 1982; Schultz *et al.*, 1977). Die Freisetzung von NO führt u.a. zur Relaxation der Gefäße (Drexler *et al.*, 1992) und so beispielsweise zu einer Regulation des Blutdrucks.



Die Senkung eines pathologisch erhöhten Blutdrucks, der ein wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ist, verringert Häufigkeit und Schwere kardiovaskulärer Ereignisse (Kannel, 2000) und ist daher ein wichtiger Bestandteil der vasoprotektiven Wirkung von NO. Zusätzlich wirkt NO antiadhäsiv (Kubes *et al.*, 1991), antiproliferativ (Scott-Burden & Vanhoutte, 1993) und auch antioxidativ (Balla *et al.*, 1992; Recalcati *et al.*, 1998). Eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit ist Zeichen der endothelialen Dysfunktion und ist assoziiert mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Atherosklerose (Lerman *et al.*, 2005).

1.3 Atherosklerose

1.3.1 Definition der Atherosklerose

Atherosklerose wird im Volksmund häufig als „Arterienverkalkung“ bezeichnet, ein in dieser Definition vermeintlich statischer Zustand, in dem es durch Verengung und

Versteifung der Arterien zu Durchblutungsstörungen kommen kann. Die Erkrankung „Atherosklerose“ ist aber kein statischer, steifer Zustand, sondern ein dynamischer Prozess, der sich als chronisch inflammatorisches Ereignis skizzieren lässt, das aus Interaktion zwischen modifizierten Lipoproteinen, Makrophagen, T-Zellen und zellulären Elementen der arteriellen Gefäßwand resultiert. Dieser inflammatorische Prozess kann zu einer Intimahyperplasie führen, die das Gefäßlumen verengt (Glass *et al.*, 2001) und zu Ischämie des Herzens, des Gehirns oder der Extremitäten führen und in einen Infarkt münden kann. Herzinfarkt und Schlaganfall stellen dabei die akut lebensbedrohlichen Symptome eines unter Umständen jahrzehntelangen Prozesses der Pathogenese einer Atherosklerose (Atherogenese) dar.

1.3.2 Pathogenese der Atherosklerose

Im 19. Jahrhundert existierten zwei Hypothesen, um die Pathogenese der Atherosklerose zu erklären: Die „Inkrustationstheorie“ von Rokitansky (1852) und die „Lipidhypothese“ von Virchow (1856) (Fuster *et al.*, 2005). Diese Hypothesen fokussierten sich auf Fibrin-Depositionen, Lipidakkumulation und Bildung extrazellulärer Matrix. Virchow verwandte in seiner Hypothese zum ersten Mal auch die Bezeichnung „*endarteritis deformans*“, schaffte so eine Verbindung zu inflammatorischen Geschehnissen und legte die Basis für die „*response-to-injury*“-Hypothese von Russell Ross, die mehr als ein Jahrhundert später entstand. Die „*response-to-injury*“-Hypothese besagt, dass der erste Schritt der Atherogenese, der der Entstehung atherosklerotischer Läsionen vorausgeht, die Dysfunktion des Endothels ist (Ross, 1999). Diese – im Allgemeinen als „endotheliale Dysfunktion“ bezeichnete – Veränderung der Vasoreaktivität beruht auf einem Mangel an bioaktivem NO[•]. Durch die sehr schnelle Reaktion (Geschwindigkeitskonstante: $6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}/\text{s}^{-1}$) (Goldstein *et al.*, 1995) von NO[•] mit O₂^{-•} zu Peroxynitrit (OONO⁻) (Kojda *et al.*, 1999) wird endogenes NO[•] abgefangen, wodurch dessen vasoprotektive Funktionen in der Gefäßwand gehemmt werden (Munzel *et al.*, 2000). Peroxynitrit selber hat ebenfalls negative Konsequenzen für die Gefäßfunktion, da es die eNOS entkoppeln kann (Kuzkaya *et al.*, 2003), d.h. aus einem NO-bildenden Enzym wird ein Enzym, das Superoxidanionen produziert. Peroxynitrit hemmt darüber hinaus auch die Guanylatzyklase und Prostazyklinsynthese, die für die Vasodilatation ebenfalls von großer Bedeutung sind.

Neben erhöhtem vaskulären „oxidativen Stress“ durch die Bildung oxidativer Sauerstoffradikale wie $O_2^{\cdot -}$ und der Reaktion zu Peroxynitrit kann eine Dysfunktion des Endothels auch durch hohe Konzentrationen modifizierten LDLs (Griendling *et al.*, 1997; Morel *et al.*, 1988; Navab *et al.*, 1996) oder durch vollständige Disruption bestimmter Bereiche des Endothels (Ross *et al.*, 1973) induziert werden. Außerdem impliziert eine endotheliale Dysfunktion eine erhöhte Permeabilität für Plasmalipoproteine (Ross, 1999). Darüber hinaus wird durch die Aufregulation bestimmter scherstressresponsiver Gene in diesen Bereichen die normale endotheliale Hämostase (weiter) gestört und es resultiert eine erhöhte Expression von (Leukozyten)-Adhäsionsmolekülen wie z.B. Selektinen, interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAMs) und vaskulären Zell-Adhäsionsmolekülen (VCAMs). Dies führt zur Adhäsion, Migration und Akkumulation von Monozyten und T-Zellen und zu den frühesten Ausprägungsformen atherosklerotischer Läsionen, den sogenannten „*fatty streaks*“ (Ross, 1999), die schon in Kleinkindern nachweisbar sind (Napoli *et al.*, 1997). Charakteristisch ist ihre Zusammensetzung aus Lipid-beladenen (Aufnahme oxidierter LDL-Partikel) Monozyten/Makrophagen (sogenannten Schaumzellen) und T-Lymphozyten (Stary *et al.*, 1994). Im späteren Verlauf migrieren auch glatte Muskelzellen aus der Gefäßwand in die Bereiche der „*fatty streaks*“. Die Progression von „*fatty streaks*“ zu intermediären und fortgeschrittenen, komplizierten, atherosklerotischen Läsionen geht einher mit der Ausbildung einer „fibrotischen Kappe“ (Paulsson *et al.*, 2000; Ross, 1999) und kann als eine Art fibrotische Antwort auf die Schädigung des Gefäßendothels verstanden werden. Durch Ausbildung der fibrotischen Kappe, die u.a. aus glatten Muskelzellen besteht, wird die sich entwickelnde Läsion vom Gefäßlumen separiert. Die Läsion selber bildet mit Fortschreiten einen nekrotischen Kern aus, der das Resultat apoptotischer und nekrotischer Prozesse, erhöhter proteolytischer Aktivität und Lipidakkumulation ist. Parallel zu diesen im Plaque stattfindenden Ereignissen dehnt sich ein Plaque – durch eine kontinuierliche Adhäsion von Leukozyten und ihr Einwandern in die Läsion – immer von den Schulterbereichen her aus (Ross, 1999).

1.3.3 Von der Atherosklerose zur Thrombose – Plaqueinstabilität

Obwohl ischämischen Symptomen eine zunehmende Verengung des Gefäßlumens zugrunde liegt, resultieren akute kardiovaskuläre Ereignisse wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall häufig aus Rupturen fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen

(Davies *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1997). So legt auch die Analyse humaner atherosklerotischer Gefäße die Vermutung nahe, dass die Evolution fortgeschrittener, komplizierter Läsionen häufig repetitive Zyklen von Mikrohämmorrhagie und Thrombose einschließen (Glass *et al.*, 2001). Zwei Mechanismen können isoliert oder gemeinsam eine Plaqueruptur bewirken. Der erste Mechanismus beruht auf rein physikalischen Kräften und greift meist dort, wo die fibrotische Kappe sehr dünn, massiv mit Schaumzellen infiltriert und deshalb am schwächsten ist (Davies *et al.*, 1993; Fuster *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 1997). Der Prozess der Plaqueruptur ist jedoch nicht rein mechanischer Natur. Auch zelluläre Prozesse spielen eine wichtige Rolle. Der zweite Mechanismus, der zu einer Plaqueruptur führen kann, impliziert somit einen aktiven Prozess im Plaque selber. Evidenzen hierfür wurden in Atherektomien von Patienten mit akutem Koronarsyndrom gefunden. Die histopathologische Analyse der atherosklerotischen Auflagerungen zeigte, dass diese u.a. sehr reich an Makrophagen sind (Moreno *et al.*, 1994), welche wiederum in der Lage sind, extrazelluläre Matrix durch die Sekretion proteolytischer Enzyme wie z.B. Matrixmetalloproteinasen (MMPs) zu degradieren (Carmeliet, 2000; Galis *et al.*, 1994; Shah *et al.*, 1995; Shah *et al.*, 2001). Tatsächlich ko-lokalisieren MMPs in den Atherektomien mit Makrophagen (Galis *et al.*, 1994), was die Hypothese, dass Makrophagen eine Rolle für die Plaqueinstabilität spielen, unterstützt.

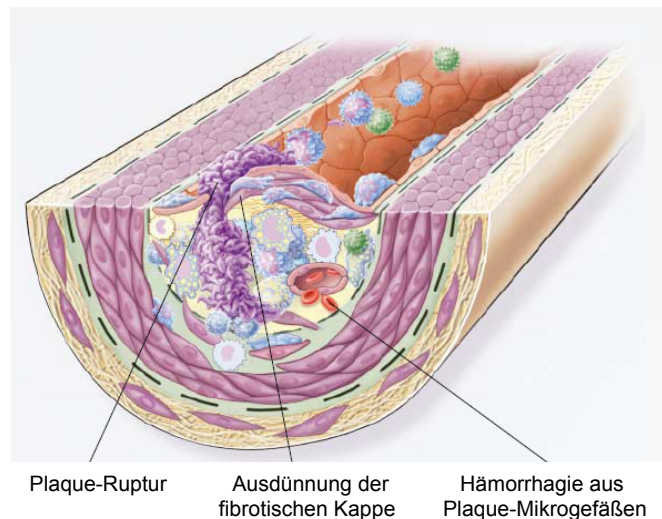


Abb. 1-4: Plaque(in)stabilität und ihre Folgen. Kontinuierlicher Influx von Monozyten (und deren Aktivierung) führt zur Sekretion von Matrixmetalloproteinasen. Das wiederum führt zur Degradation extrazellulärer Matrix und zur Ausdünnung der fibrotischen Kappe. Folgen können eine Plaqueruptur und nachfolgend arterielle Thrombosen sein (Quelle: Ross, 1999).

Plaueinstabilität und -ruptur sind also häufig Folgen der Degradation extrazellulärer Matrix im Bereich der fibrotischen Kappe.

1.4 Extrazelluläre Matrix

1.4.1 Bestandteile und Funktionen der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) wurde ursprünglich als inerte Substanz angesehen, deren einzige Aufgabe es ist, Geweben mechanische Stabilität zu verleihen. EZM ist aber weitaus mehr als ein bloßer Stabilisator. Sie ist in zahlreiche zelluläre Prozesse, wie Adhäsion, Migration, Proliferation und Regulation der Genexpression, involviert (Bissell *et al.*, 1982; Gospodarowicz *et al.*, 1978; Yamada, 1983). Ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix sind Proteoglykane, die eine wichtige Funktion in der Zell-Matrix-Adhäsion (Cole *et al.*, 1986; Cole *et al.*, 1985; Koda *et al.*, 1984; Larterra *et al.*, 1980; Larterra *et al.*, 1983; Saunders *et al.*, 1988) und Gesamt-EZM-Architektur (Hook *et al.*, 1984; Wight, 1980) einnehmen. Eine interessante und wichtige Eigenschaft von Proteoglykanen ist ihre Fähigkeit, andere Matrixkomponenten wie z.B. Fibronektin, Laminin und Thrombospondin zu binden (Frazier, 1987; Hook *et al.*, 1984; Laurie *et al.*, 1986; Sakashita *et al.*, 1980; Saunders *et al.*, 1988; Yamada, 1983) und Gewebeintegrität zu verleihen. Proteoglykane setzen sich aus einem Kernprotein mit einer oder zwei gebundenen Glykosaminoglykanketten zusammen (Ballinger *et al.*, 2004). Glykosaminoglykane (GAGs) sind lange, unverzweigte Polymere aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten (Pardue *et al.*, 2008). Die Disaccharideinheiten der GAG-Ketten werden intrinsisch karboxyliert und können dann enzymatisch weiter sulfatiert werden, so dass sie bei physiologischem pH negativ geladen sind (Wight, 1989). Die verschiedenen Typen der GAGs unterscheiden sich in ihren Disacchariduntereinheiten, den glykosidischen Bindungen, dem Ausmaß an Sulfatierung und der Art des Kernproteins, das kovalent an die Polysaccharideinheiten gebunden sein kann (Pardue *et al.*, 2008). Die Disaccharide sind wiederum aus einer Hexuronsäure (D-Glukuronsäure, L-Iduronsäure) und einem Hexosamin (D-Galaktosamin oder D-Glukosamin) aufgebaut. Einen Sonderfall stellt Keratansulfat dar, das aus D-Galaktose und einem Hexosamin aufgebaut ist.

In Abhängigkeit von den Untereinheiten ihrer Disaccharide und der Verknüpfung zwischen ihren Disaccharideinheiten werden Glykosaminoglykane in vier verschiedene Gruppen eingeteilt:

- (1) Hyaluronsäure (HA),
- (2) Chondroitinsulfat (CS) und Dermatansulfat (DS),
- (3) Heparansulfat (HS) und Heparin (H),
- (4) Keratansulfat (KS)

Tab. 1-1: Einteilung der Glykosaminoglykane basierend auf ihren Disaccharideinheiten und den Verknüpfungen zwischen den Disaccharideinheiten.

Gruppe	Abkürzung	erste Einheit	zweite Einheit	Verknüpfung
1	HA	D-Glukuronsäure	N-Acetyl-D-Glukosamin	β 1-4
2	CS	D-Glukuronsäure	N-Acetyl-D-Galaktosamin	β 1-4
	DS	D-Glukuronsäure/ L-Iduronsäure*	N-Acetyl-D-Galaktosamin	β 1-4
3	HS	D-Glukuronsäure/ L-Iduronsäure*	N-Acetyl-D-Glukosamin	α 1-4
	H	D-Glukuronsäure/ L-Iduronsäure*	N-Acetyl-D-Glukosamin	α 1-4
4	KS	D-Galaktose	N-Acetyl-D-Glukosamin	β 1-3

*L-Iduronsäure entsteht durch Epimerisierung von D-Glukuronsäure an der Carboxy-Gruppe

1.4.2 Hyaluronsäure

1.4.2.1 Aufbau und Funktionen

Hyaluronsäure (Hyaluronan, HA) ist ein einzigartiges Mitglied der GAG-Familie, da es weder sulfatiert noch an ein Kernprotein gebunden ist (Pardue *et al.*, 2008). HA ist ein lineares Glykosaminoglykan aus alternierenden [$-\beta$ (1, 4)-Glukuronsäure $-\beta$ (1, 3)-N-Acetylglukosamin-]_n Einheiten (Vigetti *et al.*, 2009) und wird nicht wie andere Glykosaminoglykane durch Sulfatierung, Epimerisierung oder N-Acetylierung modifiziert.

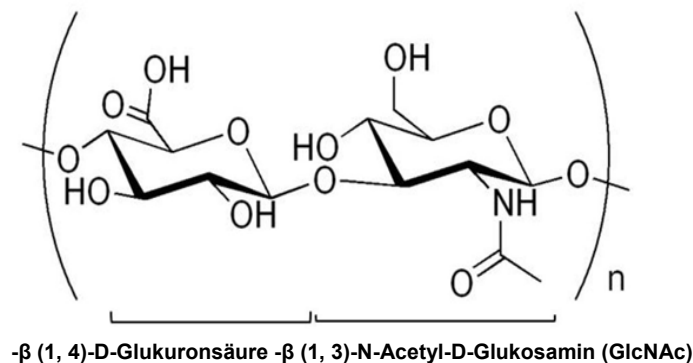


Abb. 1-5: Aufbau von Hyaluronsäure. Hyaluronsäure besteht aus alternierenden [-β (1, 4)-Glukuronsäure -β (1, 3)-N-Acetylglukosamin-]_n Einheiten.

Ursprünglich wurde Hyaluronsäure als Bestandteil des Glaskörpers des Auges beschrieben (Meyer & Palmer, 1934). Natürlich kommt sie außerdem in der extrazellulären Matrix von Binde-, Epithel- und Nervengewebe vor; darüber hinaus findet man sie in der Gelenkflüssigkeit, im Knorpel, in Blutgefäßen, in der Haut und der Nabelschnur (Pardue *et al.*, 2008). Entsprechend ihres abundanten Vorkommens in verschiedenen Geweben spielt HA auch eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung (Schoenfelder *et al.*, 2003), verleiht strukturelle Integrität und ist in Signaltransduktionsprozesse involviert (Pardue *et al.*, 2008). Außerdem ist HA an der Initiation und Progression verschiedener pathologischer Vorgänge wie Atherosklerose und Thrombose, aber auch Angiogenese beteiligt.

1.4.2.2 Synthese

Die biologischen Funktionen von HA sind an ihr Molekulargewicht und an Interaktionspartner geknüpft (Fischer & Schrör, 2007). Das Molekulargewicht der Hyaluronsäure wird auf Ebene der Synthese und vor allen Dingen durch nachfolgende enzymatische Degradation determiniert. HA ist, ihre Biosynthese betreffend, innerhalb der Proteoglykane einzigartig, weil sie nicht wie alle anderen Glykosaminoglykane im Golgi-Apparat synthetisiert und dann durch Exozytose exportiert wird. HA wird von HA-Synthasen (HASen), die in der Plasmamembran lokalisiert sind, aus aktivierten UDP-Zuckern zusammengesetzt und mit dem Wachsen der HA-Kette in den Extrazellulärraum extrudiert (Prehm, 2006;

Prehm, 1984). Eine HA-Kette kann eine Größe von bis zu 2×10^4 kD oder 2×10^5 Monosacchariden erreichen und bis zu 25 μm lang werden. Das macht HA zu einem der größten extrazellulären Moleküle. Die HAS-Isoenzyme sind Glykosyltransferasen, die in der Plasmamembran von bakteriellen und eukaryotischen Zellen lokalisiert sind (DeAngelis, 1999). In Säugetieren existieren drei HAS-Isoformen, HAS1, HAS2 und HAS3. Es ist beschrieben, dass die unterschiedlichen Synthesen in Säugetieren HA unterschiedlicher Kettenlänge und verschieden hohen Molekulargewichts synthetisieren: HAS1 und HAS3 synthetisieren HA mit einem Molekulargewicht von $2 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ Da, während HAS2 extrem lange HA-Polymere von mehr als 2×10^6 Da synthetisiert (Itano *et al.*, 1999). Eben diese HAS2-Isoform spielt in der Embryonalentwicklung eine entscheidende Rolle: Eine genetische Deletion von HAS2 verursachte in Mäusen eine embryonale Letalität an Tag 9,5, die auf Malformationen des Herzens und des Gefäßbettes zurückzuführen waren (Camenisch *et al.*, 2000). Bemerkenswerterweise verursachte die Deletion der HAS1- und HAS3-Gene keinen offensichtlichen Phänotyp, noch waren HAS1 und HAS3 in der Lage, den Verlust von HAS2 zu kompensieren. Dies sind eindeutige Hinweise für die differentielle Regulation und Funktion der HAS-Isoenzyme während der Entwicklung (Fischer & Schrör, 2007).

1.4.2.3 Enzymatische Degradation

Im Menschen sind 5 verschiedene Hyaluronidasen bekannt: Hyal1, Hyal 2, Hyal 3, Hyal 4 und PH20 (Csoka *et al.*, 2001). Ein sechstes Mitglied dieser Familie, Phyal1, ist ein Pseudogen, das nicht translatiert wird (Stern *et al.*, 2006b). Hyal 1 und Hyal 2 sind die Hyaluronidasen, die den wesentlichen Teil der HA-Katabolisierung in somatischen Geweben bewerkstelligen. Hyal 2 ist ein GPI-verankertes Plasmamembranprotein, das hochmolekulare HA in 20 kDa-Fragmente spaltet, während Hyal1 ein lysosomales Enzym mit einem pH-Optimum im sauren Bereich ist, das HA vornehmlich in Tetrasaccharide degradiert. Die Größe der HA-Polymere ist – wie bereits erwähnt – entscheidend für ihre biologische Aktivität. Hochmolekulare HA mit einer Größe von 4×10^2 bis 2×10^4 kDa hat eine Reihe von Aufgaben, die von Hydratisierung des Gewebes und Volumenexpansion bis hin zu anti-apoptotischen Effekten, die über NF κ B und CD44 mediiert sind (Fieber *et al.*, 2004; Wolf *et al.*, 2001), reichen. Die Fragmentierung von HA durch Hyaluronidasen führt in letzter Konsequenz zu HA-Fragmenten, deren biologische Rolle sich

drastisch von der hochmolekularen HA unterscheidet (Stern *et al.*, 2006a). HA-Fragmente sind angiogen, proinflammatorisch und stimulieren Immunantworten (Powell *et al.*, 2005). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass hochmolekulare (HMW)-HA homeostatische Funktionen hat, während eine Degradation von HA eher eine Art „Gefahrensignal“ in Antwort auf Gewebsverletzung und Inflammation darstellt (Stern *et al.*, 2006a).

1.4.3 Hyaladherine

Mit HA interagierende Moleküle, die auch Hyaladherine genannt werden, binden HA spezifisch über HA-Bindedomänen (Day *et al.*, 2002). So kann HA als polyvalentes Substrat für die Bindung von Proteoglykanen, wie z.B. Aggrekan im Knorpel (Margolis *et al.*, 1994) und Versikan in Blutgefäßen (Yao *et al.*, 1994), oder Nicht-Proteoglykan-Hyaladherinen, wie z.B. Tumor-Nekrose-Faktor stimuliertes Gen 6 (TSG-6) (Lee *et al.*, 1992), dienen. In Abhängigkeit von Menge und Art der Hyaladherine kann HA nicht-kovalent zu großen perizellulären und extrazellulären Netzwerken verbunden werden. Die so etablierte lockere und hoch hydratisierte HA-Matrix hat wichtige Funktionen in der Gewebe-Homeostase, bestimmt biomechanische Eigenschaften und beeinflusst den zellulären Phänotyp durch Interaktion mit zellulären HA-Rezeptoren (Fischer & Schrör, 2007).

1.4.4 HA-Rezeptoren

HA-Rezeptoren stellen eine weitere Ebene der Komplexität der durch HA mediierten biologischen Effekte dar. In glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) interagiert HA mit seinen Rezeptoren CD44 und RHAMM (*receptor of HA mediated motility*) und aktiviert diese. CD44 und RHAMM sind in Signaltransduktionswege involviert, die proliferative, migratorische und anti-apoptotische Aktivitäten von HA einschließen. CD44 ist ein integrales Membranprotein, das extensivem *Splicing* unterliegt (Bajorath *et al.*, 1998). Viele Effekte von HA auf zelluläre Phänotypen und biologische Prozesse einschließlich Adhäsion, Migration, Proliferation und Angiogenese involvieren von CD44 abhängige Signaltransduktionsprozesse und eine Reorganisation des Zytoskeletts (Bourguignon *et al.*, 1998; Fujita *et al.*, 2002). RHAMM ist auf der Zelloberfläche lokalisiert, konnte aber auch in intrazellulären Kompartimenten wie dem Zytoplasma, dem Zytoskelett, Mitochondrien und sogar im Zellkern nachgewiesen werden (Assmann *et al.*, 1998; Mohapatra *et al.*, 1996). Auf

der Oberfläche lokalisiertes RHAMM dient als Ko-Rezeptor für integrale Membranproteine, wie den PDGF-Rezeptor und aktiviert eine Reihe von Signaltransduktionswegen, einschließlich der Aktivierung von src, fokalen Adhäsionskinasen (FAK) und extrazellulär regulierter Kinase (ERK1/2).

1.4.5 Hyaluronsäure bei Atherosklerose und Thrombose

Atherosklerose und Restenose sind durch massive Veränderungen in Gehalt und Verteilung von Hyaluronsäure charakterisiert (Toole *et al.*, 2002). In frühen experimentellen Läsionen konnte in Tieren gezeigt werden, dass der Gehalt an Hyaluronsäure dramatisch ansteigt (Helin *et al.*, 1971; Wight *et al.*, 1983). In diesen frühen Läsionen ist Hyaluronsäure massiv um proliferierende und migrierende, arterielle, glatte Gefäßmuskelzellen (VSMCs) angereichert (Chajara *et al.*, 1996; Chajara *et al.*, 2000; Riessen *et al.*, 1996; Savani *et al.*, 1995). Die Akkumulation von Hyaluronsäure geht dabei häufig mit einem Anstieg von HA-assoziierten Molekülen, wie Versikan (Geary *et al.*, 1998; Nikkari *et al.*, 1994; Wolf *et al.*, 1994), TSG-6 (Ye *et al.*, 1997) und CD44 (Jain *et al.*, 1996), einher. Darüber hinaus ist Hyaluronsäure auch in Regionen atherosklerotischer Läsionen angesiedelt, die inflammatorische Zellen wie Makrophagen und Lymphozyten enthalten (Evanko *et al.*, 1998; Levesque *et al.*, 1994). Die Extravasation von Leukozyten aus dem Blut in die Gefäßwand wird durch HA unterstützt: Auf der Oberfläche von Endothelzellen über CD44 (Nandi *et al.*, 2000) oder RHAMM (Lokeshwar *et al.*, 2000) gebundene HA interagiert während dieses Prozesses spezifisch mit CD44 auf der Leukozytenoberfläche (DeGrendele *et al.*, 1996; Mohamadzadeh *et al.*, 1998; Siegelman *et al.*, 1999) und ermöglicht so eine Rekrutierung von Leukozyten. Diese Beobachtungen schreiben HA eine entscheidende Rolle zu Beginn der inflammatorischen Phase zu, von der angenommen wird, dass sie entscheidenden Einfluss auf die Etablierung atherosklerotischer Läsionen hat (Ross, 1999). Das Vorkommen von HA in makrophagenreichen Regionen des Plaques (Evanko *et al.*, 1998; Levesque *et al.*, 1994) unterstützt die Hypothese, dass sie die inflammatorische Phase akzellerieren könnte, indem sie als Substrat für Makrophagen dient und so zu einer Retention von Immunzellen führt (Toole *et al.*, 2002). Hyaluronsäure ist auch in Plaques mit Lipiddepositionen zu finden (Evanko *et al.*, 1998; Levesque *et al.*, 1994). *In vitro*-Untersuchungen konnten zeigen, dass HA über hydrophobe Wechselwirkungen mit Phospholipiden interagiert (Pasquali-Ronchetti *et al.*, 1997). Eine hohe Konzentration

solcher Moleküle, die Gewebe aufweichen und quellen lassen, können zu einer Schwächung des Plaques führen und ihn für eine Ruptur anfälliger machen (Toole *et al.*, 2002). So wird HA auch als pro-thrombogene Matrixkomponente diskutiert: Beobachtungen von Kolodgie *et al.* haben gezeigt, dass eine massive Akkumulation von HA an der luminalen Seite humaner, erodierter Plaques, die fatale Koronarthrombosen verursachten, vorhanden war (Kolodgie *et al.*, 2002).

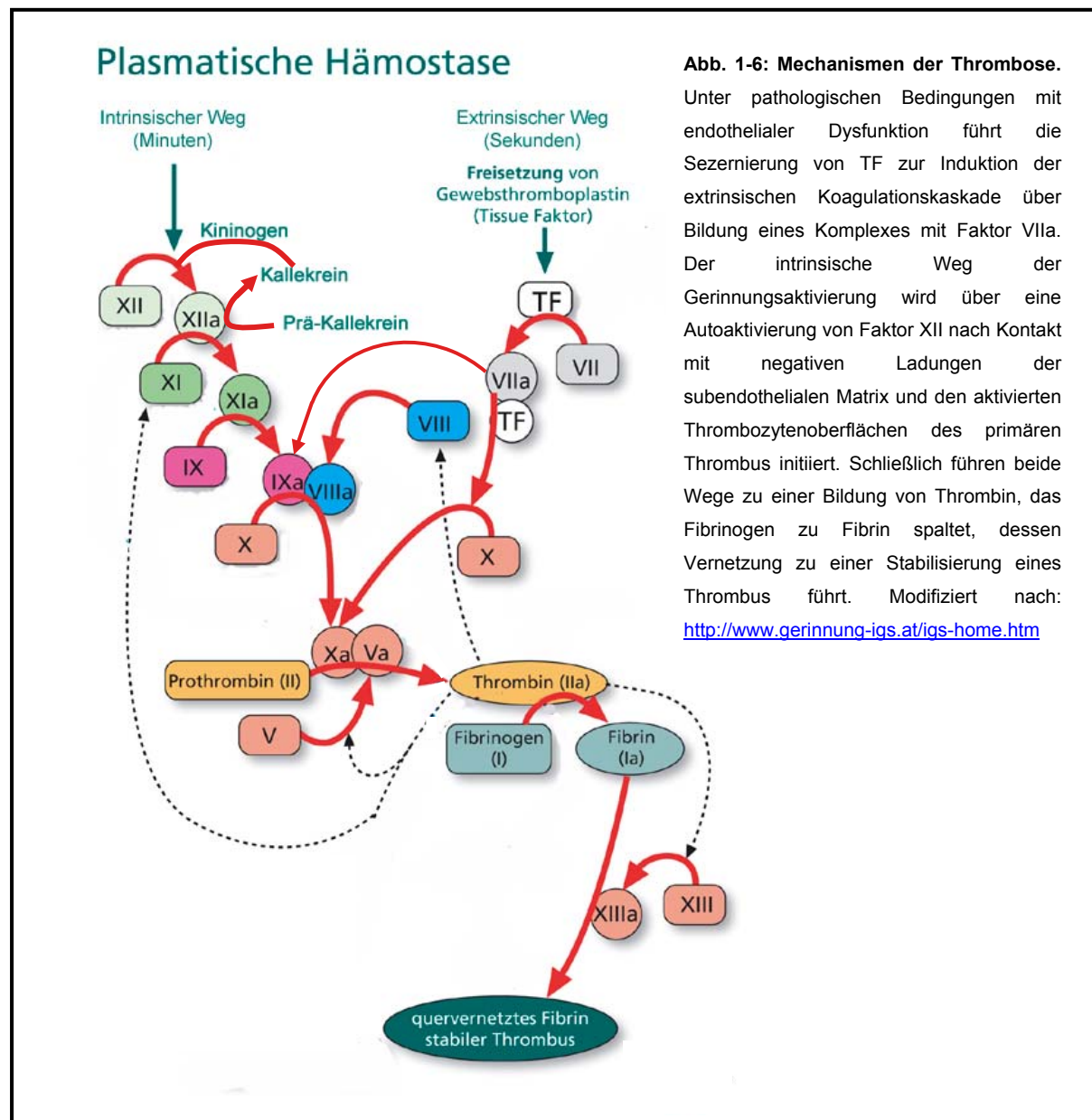
1.5 Thrombose

Thrombosen resultieren meist aus der Ruptur instabiler, atherosklerotischer Plaques. In Koronaratherektomien von Patienten mit instabiler *Angina pectoris* konnte neben der Lokalisation von Makrophagen mit MMPs auch eine starke Korrelation zwischen Makrophagen und dem Glykoprotein „tissue factor“ (TF) gezeigt werden (Moreno *et al.*, 1996). Prinzipiell initiiert TF die extrinsische Koagulationskaskade und wird als Haupt-Regulator von Koagulation, Homeostase und Thrombose angesehen (Nemerson, 1988).

1.5.1 Die Gerinnungskaskade

TF formt einen hoch-affinen Komplex mit Faktor VII (Banner *et al.*, 1996; Rauch *et al.*, 2001). Hierdurch kommt es zur Aktivierung von FVII zu FVIIa. Der TF/FVIIa-Komplex katalysiert dann durch proteolytische Spaltung von Faktor X in Gegenwart von Calciumionen die Aktivierung zu Faktor Xa, aktiviert aber auch Faktor IX zu FIXa und schafft damit die Voraussetzung zur Bildung eines membrangebundenen, intrinsischen Tenase-Komplexes aus FIXa und FVIII. Dieser Tenase-Komplex kann FX ebenfalls zu FXa aktivieren, wodurch die Menge aktivierten Faktors X amplifiziert wird. Die Aktivierung eines weiteren Gerinnungsfaktors, des Faktors V, führt zur Entstehung eines membrangebundenen Komplexes aus FVa, FXa und Prothrombin, dem Prothrombinase-Komplex, durch den schließlich die Spaltung und Aktivierung von Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa) vermittelt wird. Diese Verknüpfung unterschiedlicher Aktivierungsvorgänge und die dadurch entstehende Amplifizierung des ursprünglichen Signals führt nach einem Trauma zu einem schnellen Blutungsstillstand (Davie *et al.*, 1964; Mann, 1999; Mann *et al.*, 1990; McFarlane *et al.*, 1964).

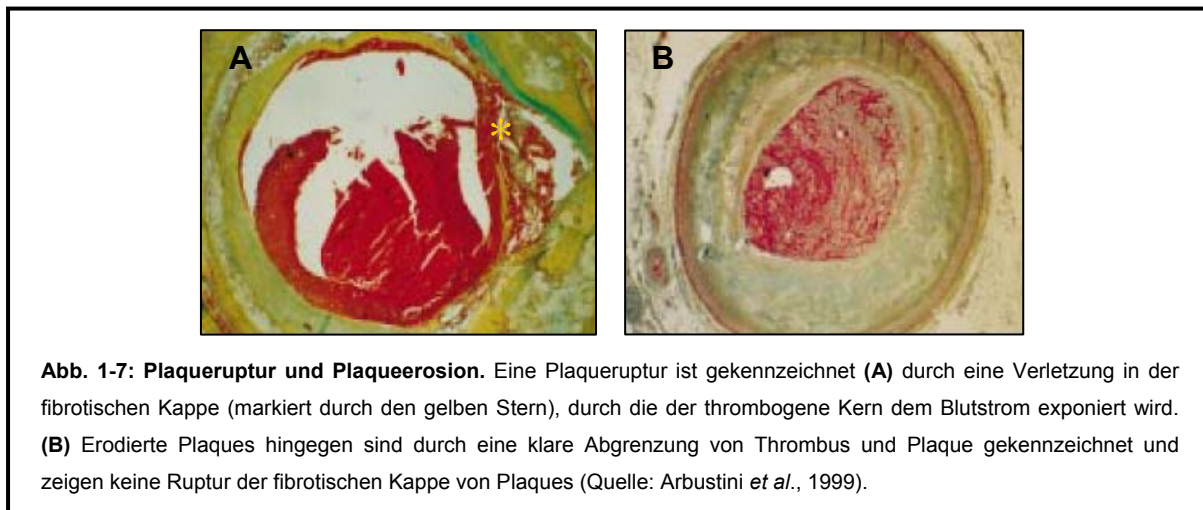
Neben der Aktivierung der Gerinnungskaskade über den extrinsischen Weg kann die sekundäre Homeostase auch über einen zweiten, intrinsischen Weg, das Kontaktphasensystem, ausgelöst werden (Kaplan, 1978). Bei der Kontaktaktivierung wird FXII durch den Kontakt mit negativen Ladungen der subendothelialen Matrix und mit den aktivierten Thrombozytenoberflächen des primären Thrombus über einen selbstaktivierenden Mechanismus in FXIIa überführt und kann dadurch inaktives Präkallikrein zu aktivem Kallikrein spalten. Kallikrein wiederum kann seinerseits in einem Komplex mit hochmolekularem (HMW)-Kininogen (HK) an negativ geladenen Zelloberflächen FXII ebenfalls zu FXIIa aktivieren (Schousboe, 1993; Shore *et al.*, 1987; Wiggins *et al.*, 1979). Dieser positive Rückkopplungsmechanismus führt zu einer hohen Konzentration von FXIIa, der FXI zu FXIa spaltet. Substrat für den Faktor XIa ist der Faktor IX, der in Gegenwart von Calciumionen und Phospholipiden analog zur Aktivierung durch den Tissue-Faktor-Faktor-VIIa-Faktor-Xa-Komplex proteolytisch zu Faktor IXa aktiviert wird (Kontaktphasenkomplex). An dieser Stelle konvergieren das intrinsische und extrinsische System der Gerinnungsaktivierung, und über den oben beschriebenen intrinsischen Tenase-Komplex (FVIIIa/FIXa) kommt es ebenfalls zu einer FX-Aktivierung (Schmaier *et al.*, 1999; Silverberg *et al.*, 1980; Thompson *et al.*, 1979). Sowohl über den extrinsischen als auch über den intrinsischen Weg gebildetes Thrombin kann dann Fibrinogen in Fibrin-Monomere spalten, die durch die thrombinaktivierte Transglutaminase FXIIIa zu Fibrin-Polymeren vernetzt werden (Fenton *et al.*, 1988). Das entstehende Fibrin-Gerinnsel dient der Verstärkung des primären Wundverschlusses der aggregierten Blutplättchen.



1.5.2 Plaqueruptur versus Plaqueerosion

In 30 % bis 40 % der Fälle, in denen koronare Thrombosen auftreten, kann jedoch keine Plaque-Ruptur identifiziert werden. Neben Rupturen können Plaque-Erosionen zu arteriellen Thrombosen führen. Die Abgrenzung beider Ereignisse erfolgt über histopathologische Merkmale (Arbustini *et al.*, 1999). So wird ein rupturierter Plaque über das Vorhandensein eines luminalen Thrombus in Kontinuität mit dem nekrotischen Kern des eigentlichen Plaques sowie eine unterbrochene fibrotische Kappe definiert. Charakteristisch für erodierte Plaques hingegen ist eine klare Abgrenzung vom Plaque (Diskontinuität), der zwar dysfunktionelle Endothelzellen

aufweist, aber keine Verletzung der fibrotischen Kappe erkennen lässt (Farb *et al.*, 1996).



Interessanterweise ist die Prävalenz einer Plaqueerosion bei Frauen im Vergleich zu Männern signifikant erhöht. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass sich Plaques bei Frauen morphologisch von denen bei Männern unterscheiden, oder, dass selbst in sehr ähnlichen Läsionen das thrombogene Potential bei Frauen höher ist als bei Männern (Arbustini *et al.*, 1999; Farb *et al.*, 1996).

1.6 Hormone bei Atherosklerose und Thrombose

1.6.1 Epidemiologische Erkenntnisse

Neben der erhöhten Inzidenz von Plaqueerosionen bei Frauen zeigt die Analyse von Mortalitätsdaten für Myokardinfarkt (MI), Schlaganfall und venöse Thromboembolien durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO), dass die Mortalität aufgrund kardiovaskulärer Ereignisse bei Frauen mit dem Alter signifikant ansteigt. Die MI-Mortalität ist z.B. in Amerika zwar insgesamt zweimal höher als im westpazifischen Bereich, aber prinzipiell gilt, dass sie im gebärfähigen Alter ($1-7/1 \times 10^5$ pro Jahr bei 35 bis 44 Jahre alten Frauen) niedrig ist; prämenopausale Frauen haben ein 3-5fach reduziertes Risiko im Vergleich zu Männern. Ähnliches gilt für die Schlaganfall-Mortalität, die mit $12/1 \times 10^5$ 30 - 50 % der Häufigkeit bei Männern entspricht (2006). Nach der Menopause nähert sich das kardiovaskuläre Risiko von Frauen dem von Männern an (Mendelsohn *et al.*, 1999). Die Menopause ist mit einem Verlust an endogenen, ovariellen Steroiden (Estrogenen und Gestagenen) assoziiert. Weil neben der Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen aber auch die der

Osteoporose bei postmenopausalen Frauen ansteigt, ist es nahe liegend, dass ein Abfall endogener Estrogenspiegel eine entscheidende Rolle in der Entwicklung dieser Erkrankungen bei alternden Frauen spielen könnte (Penckofer *et al.*, 2003). Weil kardiovaskuläre Erkrankungen auch die Haupttodesursache bei Frauen in den westlichen Industrienationen sind, war der Gebrauch einer Hormonersatz-Therapie (HRT) oder einer Estrogen-Ersatztherapie (ERT) zur Primär- und Sekundärprävention zunächst logisch. Die Hormonersatztherapie ist eine Substitutionstherapie mit einem Estrogen und einem Gestagen und ist abzugrenzen von der Estrogen-Substitutionstherapie, bei der lediglich ein Estrogen alleine substituiert wird. Der Gebrauch der HRT stieg in den 1960ern und Mitte der 1990er Jahre exponentiell an und führte dazu, dass 1999 weltweit geschätzt 20 Millionen postmenopausale Frauen mit Hormonen substituiert wurden (Beral *et al.*, 2002). Die Applikation der Hormone in der Substitutionstherapie lässt sich in drei Formen differenzieren: (i) Estrogen alleine, (ii) Estrogen plus kontinuierliches Gestagen oder (iii) Estrogen plus zyklisches Gestagen. Da Estrogene alleine mit einem erhöhten Risiko für Endometriumhyperplasie und -krebs verbunden sind, ist diese Anwendung auf Frauen beschränkt, die sich einer Hysterektomie unterzogen haben. Die Kombinations-HRT ist somit die Substitutionstherapie der Wahl für Frauen mit intaktem Uterus (Grady *et al.*, 1992). Die zwei Hauptformen der substituierten Estrogenkomponente sind orale, konjugierte, equine Estrogene (CEE) und mikronisiertes Estradiol, aber auch transdermale Formen von 17- β -Estradiol sind verfügbar (Gomes *et al.*, 2004). CEEs sind eine komplexe Mischung aus mindestens 9 verschiedenen Estrogenen, von denen einige nicht bei Menschen vorkommen (Hoibraaten *et al.*, 1999).

1.6.2 Zellbiologische Untersuchungen

Die vorstehend beschriebenen, epidemiologischen Erkenntnisse werden durch zellbiologische *in vitro*-Resultate unterstützt. Wie unter Punkt 1.3.2 auf den Seiten 6 und 7 beschrieben, sind glatte Muskelzellen ein wichtiger Zelltyp, der mit fortschreitender Evolution der Plaques zunehmend in die Neointima atherosklerotischer Läsionen einwandert und so zu einer progressiven luminalen Verengung führen kann. Hinsichtlich des Einflusses von Estrogenen auf vaskuläre, glatte Gefäßmuskelzellen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass 17- β -Estradiol die Migration glatter Muskelzellen als Antwort auf PDGF-BB reduziert (Dubey *et al.*,

1999; Dubey *et al.*, 2001). Neben der Migration wird auch die PDGF-BB induzierte Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen durch Estrogene inhibiert (Dai-Do *et al.*, 1996; Vargas *et al.*, 1993). PDGF-BB ist als Mitogen einer der Hauptfaktoren, die zu Atherosklerose und Restenose beitragen (Raines *et al.*, 1996) und akkumuliert in atherosklerotischen Läsionen (Ross, 1993). Dementsprechend ist die durch Estradiol vermittelte Inhibition der Migration und Proliferation humaner, glatter Gefäßmuskelzellen möglicherweise maßgeblich daran beteiligt, dass die Ausbildung und Progression atherosklerotischer Läsionen inhibiert oder zumindest verlangsamt wird. So deuten diese an humanen Zellen *in vitro* erhobenen Daten auch auf eine atheroprotektive Rolle des Estradiols hin.

1.6.3 Schlussfolgerungen aus Experimenten an Tiermodellen

Neben den aus epidemiologischen Beobachtungen und zellbiologischen Resultaten gewonnenen Erkenntnissen konnten darüber hinaus auch Tierexperimente an Affen (Clarkson *et al.*, 2001; Kavanagh *et al.*, 2009) und Mäusen (Bourassa *et al.*, 1996; Elhage *et al.*, 1997; Elhage *et al.*, 1998; Marsh *et al.*, 1999) zeigen, dass eine Estrogensubstitution wahrscheinlich mit anti-atherosklerotischen Effekten einhergeht. In einer Untersuchung von Bourassa *et al.* reduzierte Estradiol die Atherosklerose bei Mäusen, wobei in dieser Studie mit 6, 14 und 28 µg Estradiol/Tag Dosierungen substituiert wurden, die die Substitutionsmengen zum Erreichen physiologischer Konzentrationen überschritten (Bourassa *et al.*, 1996). Auch Marsh *et al.* konnten an Mäusen zeigen, dass die Substitution von Estrogenen atheroprotektive Wirkungen entfaltet (Marsh *et al.*, 1999). Elhage *et al.* konnten nach Estradiolsubstitution eine Inhibition der Ausbildung von „fatty streaks“ beobachten (Elhage *et al.*, 1997). In diesen Untersuchungen wurden die Hormone allerdings nicht wie in den vorher zitierten Arbeiten für einen Zeitraum von 90 Tagen, sondern lediglich über 60 Tage substituiert und die Tiere wurden nicht mit einer die Atherosklerose beschleunigenden Western-Diät gefüttert, sondern erhielten normales Futter.

1.6.4 Paradoxon – Protektion vs. Destruktion

1.6.4.1 Die Rolle von Gestagenen

Dennoch konnten zwei kontrollierte, randomisierte Humanstudien keinen protektiven Effekt einer Hormonersatztherapie zeigen, weder für die primäre Prävention (WHI) (Rossouw *et al.*, 2002), noch für die sekundäre Prävention (HERS)

(Hulley *et al.*, 1998). Deshalb wurde die Annahme, dass Estrogene uneingeschränkt atheroprotektiv seien, verworfen. Man geht heute davon aus, dass Estrogene nur bei jungen Frauen, wenn sie früh nach der Menopause substituiert werden, protektiv wirken, während die Substitution von Frauen mit fortgeschrittener Atherosklerose Jahre oder Jahrzehnte nach der Menopause nachteilige Auswirkungen haben könnte („Timing“-Hypothese) (Barrett-Connor, 2007).

Im Estrogen-Arm der WHI-Studie konnte keine Inhibition von kardiovaskulären Erkrankungen gezeigt werden (Anderson *et al.*, 2004) und in der Gruppe, die CEE und das Gestagen Medroxyprogesteronacetat (MPA) erhielt, wurde sogar ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen beschrieben. Das könnte darauf hindeuten, dass MPA in atherogene Prozesse und evtl. Atherothrombose involviert sein könnte (Rossouw *et al.*, 2002). Das Verständnis von Gestagenen jedoch wird durch die Tatsache verkompliziert, dass viele Derivate entwickelt wurden, die sich in der Aktivierung oder Antagonisierung der verschiedenen Steroidrezeptoren unterscheiden.

1.6.4.2 Medroxyprogesteronacetat (MPA)

Es stellt sich die Frage, ob die potentiell negativen Effekte des MPA substanzbedingt sind oder einen Klasseneffekt der Gestagene darstellen. Es ist bekannt, dass Koagulation und Fibrinolyse durch Estrogene beeinflusst werden. Vergleicht man den Effekt von CEE und CEE/MPA auf verschiedene homeostatische Faktoren, konnte jedoch kein unvorteilhafter Effekt durch die Addition des Gestagens auf durch CEE induzierte Veränderungen beobachtet werden (Lobo *et al.*, 2001; Nozaki *et al.*, 1999). Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass MPA den Thrombinrezeptor in der Gefäßwand aufreguliert (Herkert *et al.*, 2001). Seine Aktivierung durch Thrombin spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Atherosklerose und Thrombose. So könnte MPA maßgeblich an einer Steigerung der prokoagulatorischen und vasokonstriktorischen Aktivität atherosklerotischer Arterien beteiligt sein (Kuhl, 1996). Neben glukokortikoiden Partialeffekten zeigt MPA anti-androgene Aktivität, was dazu führen könnte, dass positive anti-atherogene Estrogeneffekte inhibiert werden könnten. MPA wird zusätzlich zur HRT auch bei prämenopausalen Frauen als Kontrazeptivum und zur Behandlung verschiedener gynäkologischer Beschwerden wie Endometriose, polyzystischem Ovarialsyndrom und Oligomenorrhoe verwendet (Cullins, 1996). Deshalb ist es von nicht zu

unterschätzender gesundheitspolitischer Relevanz, die Effekte von MPA und Estradiol – alleine und in Kombination – auf Atherosklerose und Atherothrombose zu evaluieren und so die Effekte auf kardiovaskuläre Erkrankungen besser zu verstehen. Nur so kann das Problem der Nutzen/Risiko-Abwägung bei der Entscheidung der Frage, ob man Frauen mit einer Hormonersatztherapie behandeln sollte, um Osteoporose vorzubeugen und wechseljahrestypische Beschwerden zu reduzieren, gelöst werden (Arnal *et al.*, 2004).

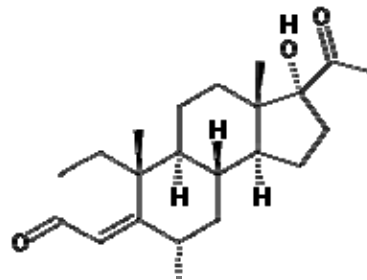


Abb. 1-8: Strukturformel von Medroxyprogesteronacetat (MPA).

In diesem Kontext sind neue Tierexperimente erforderlich, die – vor dem Hintergrund der epidemiologischen Erkenntnisse – eine mechanistische Aufklärung des aufgezeigten Paradoxons und eine Entwicklung weiterführender Therapiestrategien ermöglichen.

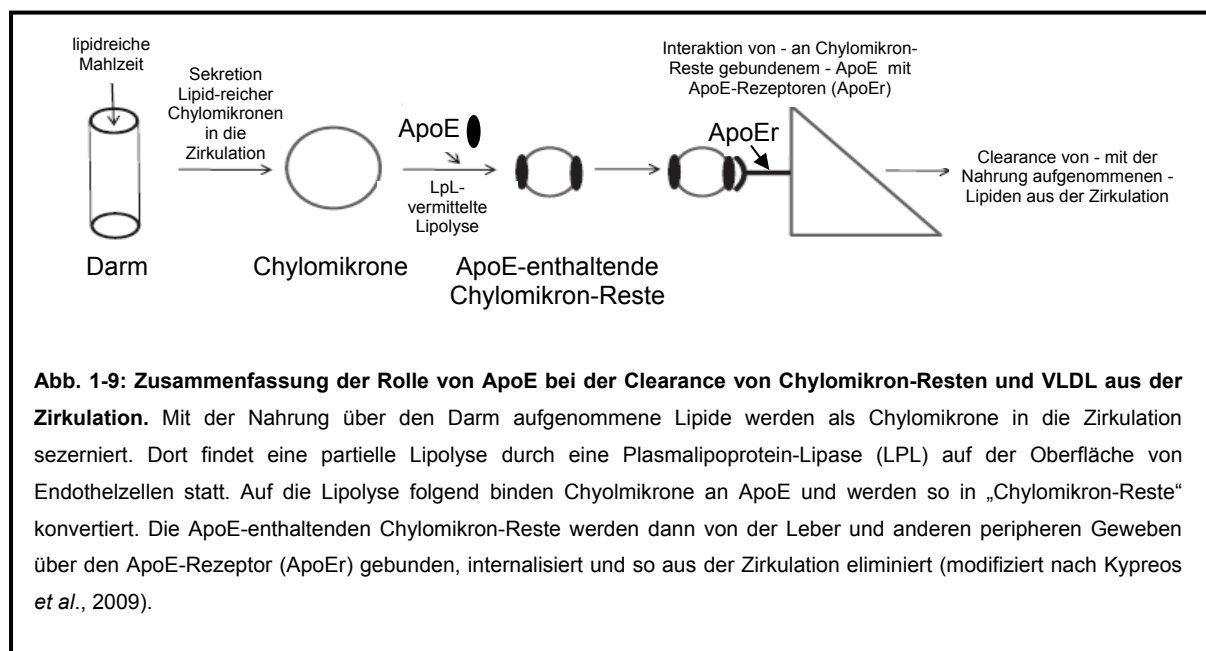
1.7 Das Tiermodell „Maus“ und seine Bedeutung für Atherosklerose und Thrombose

Wie sich an ihrer Verwendung für die Erforschung der verschiedensten Krankheiten, deren genetischen Ursachen, deren Pathogenese, deren molekularen Mechanismen oder deren Pharmakotherapie manifestiert, sind Tiermodelle für biomedizinische Forschungszwecke von enormer Wichtigkeit (Daugherty, 2002). Die Maus hat sich dabei zu einem „Schlüsselorganismus“ entwickelt, um Fortschritte im Verständnis von Genen und Signaltransduktionskaskaden zu erzielen, die in Krankheitsprozesse, u.a. in vaskulär-pathologische Prozesse der Atherogenese, involviert sind (Malakoff, 2000). Wurde zu Beginn ein Großteil der Atherosklerose-Forschung an Kaninchen, Schweinen oder nicht-humanen Primaten durchgeführt, wird heute überwiegend das Modell „Maus“ zur Aufklärung derartiger Fragestellungen verwendet. Die geringe

Größe der Tiere, die kurze Generationszeit, die relativ einfache Pflege und die Verfügbarkeit von genetisch definierten Inzuchtstämmen, um genetische Abweichungen zu minimieren, machen die „Maus“ zu dem am häufigsten verwendeten, experimentellen (Tier-)Modell für atherosklerotische Fragestellungen (Daugherty, 2002; Malakoff, 2000).

1.7.1 Die ApoE-defiziente Maus

Die sich in Mäusen mit einer Inaktivierung des Apolipoprotein E (ApoE)-Gens – unter entsprechenden diätischen Bedingungen – entwickelnden atherosklerotischen Läsionen ähneln sowohl einfachen als auch komplexen humanen Läsionen (Rosenfeld *et al.*, 2000).



Das Apolipoprotein E ist ein wichtiger Mediator für den Transport und die metabolische Clearance von zirkulierendem Cholesterol (Wang, 2005). Ist das ApoE-Polypeptid dysfunktionell oder nicht vorhanden, steigen die Spiegel zirkulierenden Cholesterols an (Piedrahita *et al.*, 1992; Plump *et al.*, 1992). Mit einem Anteil von mehr als 70 % befindet sich bei ApoE^{-/-}-Mäusen der größte Teil der Plasmalipide in VLDL-Partikeln, während die kleineren Lipoproteinfraktionen LDL und HDL den weitaus geringeren Teil ausmachen (Bourassa *et al.*, 1996). Der bekannteste Phänotyp von ApoE-defizienten Mäusen sind Hyperlipidämie und eine nicht zuletzt dadurch bedingte spontane Entwicklung von Atherosklerose (Daugherty, 2002).

1.7.2 Mausmodelle der Thrombose

Wie schon beschrieben, sind thrombotische Komplikationen vaskulärer Erkrankungen die Haupttodesursache in industrialisierten Ländern (Thom *et al.*, 2006). Das Wissen über die Entstehung eines Thrombus gewinnt zunehmend an Komplexität, ist aber noch nicht vollständig aufgeklärt. Um die Entstehung eines Thrombus weitestgehend vollständig charakterisieren zu können, sind *in vivo*-Modelle von Nöten, die es ermöglichen, die verschiedenen Komponenten und deren Interaktion zu analysieren (Westrick *et al.*, 2007). Mittlerweile sind mehrere Modelle für arterielle und venöse Thrombosen in Mäusen beschrieben worden, von denen hier zwei Modelle vorgestellt werden.

1.7.2.1 Eisen(III)-chlorid-Modell der arteriellen Thrombose

Die Verwendung von Eisen(III)-chlorid als thrombogenes Agens hat sich zu einer allgemeinen Methode zur Analyse von – einer Thrombose zugrunde liegenden – Mechanismen in transgenen Mäusen entwickelt (Day *et al.*, 2004). 1944 wurde Eisen(III)-chlorid erstmals auf die *vena cava inferior* appliziert, um eine Thrombose zu induzieren (Reimann-Hunziker, 1944). 1990 wurde diese Methode für die *arteria carotis communis* der Ratte von Kurz *et al.* adaptiert und wurde seither in zahlreichen Untersuchungen zur Evaluation verschiedenster Fragestellungen verwendet (Kurz *et al.*, 1990).

1.7.2.2 Photochemisch induzierte, arterielle Thrombose

Reaktive Sauerstoffspezies tragen zur Schädigung des Endothels bei und führen so zu Atherosklerose und Thrombose (Vandeplassche *et al.*, 1990). Die Fähigkeit des photosensitiven Farbstoffes Rose Bengal (Tetrachlorotetraiodofluorescein), reaktive Sauerstoffspezies zu produzieren, ist bekannt (Wilson *et al.*, 1991). Deshalb können Sauerstoffradikale – nach Aktivierung von Rose Bengal – genutzt werden, um den Prozess der endogenen Schädigung des Endothels zu imitieren und so effektiv lokal vaskulären Schaden zu induzieren, der zur Entstehung von Thrombosen führt (Westrick *et al.*, 2007). Rose Bengal ist insbesondere wegen seiner hohen photochemischen Effizienz und seiner niedrigen systemischen Toxizität für *in vivo*-Experimente geeignet (Wilson *et al.*, 1991). Es wird typischerweise injiziert und ist bis zu seiner Aktivierung bei einer Wellenlänge von 543 nm inert (Westrick *et al.*, 2007). Die Aktivierung des – nach Injektion systemisch zirkulierenden – Rose Bengals

induziert die Freisetzung von Singulett-Sauerstoff und Peroxylradikalen an der Stelle, an der der Laser auf das Gefäß gerichtet ist. Es ist zu vermuten, dass dieses sauerstoffradikalbasierte Modell die angenommenen Vorgänge und Mechanismen der humanen arteriellen Thrombose eher imitiert als das Eisen(III)-chlorid-Modell (Ambrosio *et al.*, 1997). Darüber hinaus ist es wahrscheinlich, dass eine mildere Form der Gefäßverletzung induziert wird, da die Zeit bis zur stabilen Okklusion der entsprechenden Arterie signifikant länger ist als im Modell der durch Eisen(III)-chlorid induzierten Thrombose. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Modell der laserbasierten photochemisch induzierten Thrombose das derzeit sensitivste Modell zur Detektion auch nur geringfügiger Unterschiede zwischen Faktoren ist, die die Thrombose beeinflussen (Westrick *et al.*, 2007).

2. Zielsetzung

Hintergrund der Arbeit ist das einleitend beschriebene Paradoxon der postulierten Atheroprotektion einer Hormonersatztherapie, die in großen, randomisierten, klinischen Studien aber nicht validiert werden konnte. Daher ist es von großem gesundheitspolitischem Interesse, den tatsächlichen Einfluss einer Hormonersatztherapie auf das kardiovaskuläre Risiko zu evaluieren. Ziel der Doktorarbeit war es, ein Mausmodell zu etablieren, mit dem die Effekte einer HRT mit Estradiol in physiologischen Dosierungen und Medroxyprogesteronacetat (MPA) in Hinblick auf

(a) Atherosklerose

und

(b) Atherothrombose

dargestellt werden können, und

(c) in diesem Modell die den jeweiligen Phänotypen zugrunde liegenden Mechanismen zu evaluieren.

Darüber hinaus ist es bekannt, dass der Prozess der Atherosklerose durch eine massive Umverteilung und Reorganisation der extrazellulären Matrix, u.a. von Hyaluronsäure, charakterisiert ist. Auch die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen ist ein wichtiger zellulärer Vorgang im Zuge der Evolution atherosklerotischer Plaques, der durch Hyaluronsäure bestimmt wird. In diesem Kontext war es ein weiteres Ziel dieser Doktorarbeit,

(d) *in vitro* den Einfluss von Estradiol auf die die Hyaluronsäure synthetisierenden Enzyme und die HA-Sekretion an humanen glatten Gefäßmuskelzellen zu analysieren.

3. *Material und Methoden*

3.1 Tierversuche

3.1.1 Versuchstiere

Die Genehmigung für alle in dieser Dissertation beschriebenen Tierversuche wurde entsprechend § 8 des Tierschutzgesetzes vom 25. Mai 1998 vom Regierungspräsidium Düsseldorf unter dem Aktenzeichen AZ 8.87-50.10.34.09 erteilt. Die Ausgangstiere für die Zucht der in den nachfolgend beschriebenen Versuchen verwendeten transgenen Apolipoprotein E defizienten (ApoE^{-/-}) Mauslinie wurden unter dem Stammmamen B6.129P2-Apoe^{tm1Unc} N11 von Taconic M&B Denmark bezogen und ursprünglich im Labor von Nobuya Maeda an der Universität von North Carolina entwickelt (Piedrahita *et al.*, 1992).

Die Zucht der transgenen Tierlinie erfolgte unter der Leitung von Frau Dr. Treiber, Leiterin der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, und unter der Leitung von Herrn Dr. Hilken, Leiter des Zentralen Tierlaboratoriums des Universitätsklinikums Essen. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen in Edelstahl- (Düsseldorf) bzw. IVC-Käfigen (Essen) bei 20 °C Raumtemperatur, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 % ± 5 % und einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus mit Kunstlicht bei 300 Lux gehalten. Alle Tiere erhielten unter tierärztlicher Kontrolle Spezialfutter der Firma Sniff und entkeimtes Trinkwasser *ad libitum* aus Flaschen.

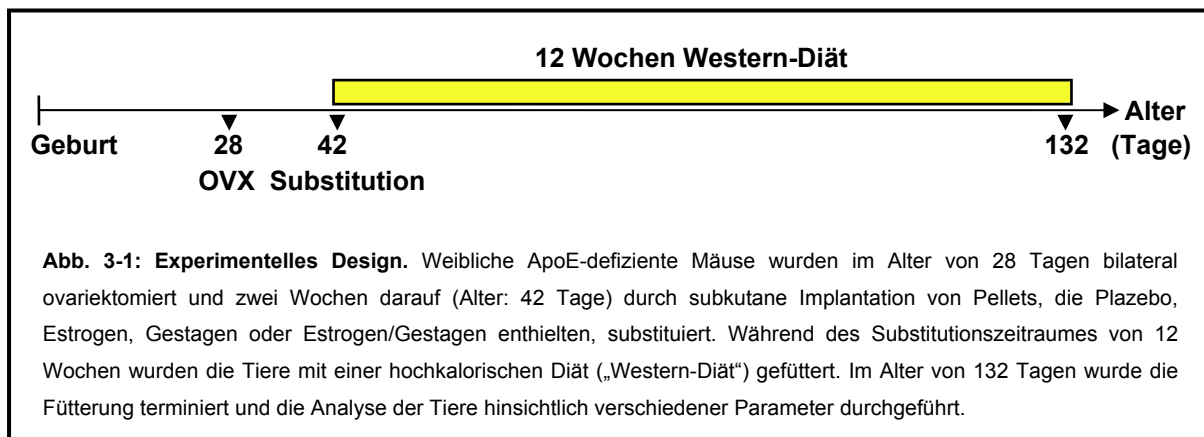
3.1.2 Versuchsgruppen und -durchführung

Für die Versuchsvorhaben wurden weibliche ApoE^{-/-}-Mäuse in sechs Gruppen eingeteilt.

1. Gruppe: keine Ovariectomie (OVX), keine Substitution
2. Gruppe: Ovariectomie, keine Substitution
3. Gruppe: Ovariectomie, Plazebo-Substitution
4. Gruppe: Ovariectomie, 17-β-Estradiol (E₂)-Substitution
5. Gruppe: Ovariectomie, Medroxyprogesteronacetat (MPA)-Substitution
6. Gruppe: Ovariectomie, E₂- und MPA-Substitution

Die Tiere aus Gruppe 1 wurden im Alter von 42 Tagen für einen Zeitraum von 12 Wochen mit einer speziellen hochkalorischen Diät bestehend aus 21 % Butterfett und 0,15 % Cholesterin („Western-Diät“) gefüttert. Die Tiere aus Gruppe 2 wurden im

Alter von 28 Tagen bilateral ovariectomiert und 2 Wochen im Anschluss an die Ovariectomie (im Alter von 42 Tagen) ebenfalls für 12 Wochen mit der „Western-Diät“ gefüttert. Das experimentelle Protokoll für die Gruppen 3 – 6 ist schematisch in Abbildung 3-1 dargestellt.



3.1.3 Operative Entfernung der Eierstöcke (Ovariectomie)

Die endogene ovarielle Steroidhormon-Produktion weiblicher ApoE^{-/-}-Mäuse wurde in den Gruppen 2 – 6 durch eine operative Entfernung der Ovarien (Ovariectomie, OVX) im Alter von 28 Tagen depletiert. Vor dem mikrochirurgischen Eingriff wurden die Mäuse gewogen und mit einer Kombination aus 100 mg/kg Esketaminhydrochlorid (Pfizer, PARKE-Davis GmbH, Karlsruhe) und 5 mg/kg Xylazin (Bayer, Leverkusen) durch intraperitoneale Applikation anästhesiert. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde anhand eines Ausbleibens des Lid- und Zwischenzehenreflexes validiert. Im Anschluss wurden die Mäuse auf einem Operationstisch fixiert. Daraufhin wurde dorsal, kurz oberhalb der unteren Extremitäten, eine ca. 1,5 cm lange Inzision entlang der Körperachse vorgenommen. Das *Peritoneum* wurde vorsichtig vom Fell präpariert und durch zwei kleine Einschnitte links und rechts der Körperachse auf einer Länge von 1 cm eröffnet. Mit einer Pinzette wurden die Ovarien vorgelagert und am Übergang zum Uterushorn abgetrennt. Das Uterushorn wurde in die Bauchhöhle reponiert und diese beidseitig mit einem resorbierbaren Faden der Stärke 5.0 (Johnson & Johnson, Norderstedt) verschlossen. Der Schnitt entlang der Körperachse wurde mit einem ebenfalls resorbierbaren Faden der Stärke 4.0 verschlossen. Die äußere Naht wurde mit Betaisodona-Lösung (Mundipharma GmbH, Limburg) desinfiziert. Zur postoperativen Analgesie wurden 5 mg/kg Carprofen (Pfizer, Berlin) s.c. injiziert. Die Carprofen-

Gabe wurde über einen Zeitraum von 3 Tagen 1x täglich wiederholt, so dass von einer guten analgetischen Therapie ausgegangen werden konnte.

3.1.4 Subkutane Implantation hormonfreisetzender Pellets

Die Substitution ovariectomierter, weiblicher ApoE^{-/-}-Mäuse mit Estrogen/Gestagen-Kombinationen wurde via subkutaner Implantation hormonfreisetzender Pellets der Firma *Innovative Research of America* (Sarasota, CA, USA) 2 Wochen nach Ovariectomie in Narkose (Ketamin 100 mg/kg und Xylazin 5mg/kg, i.p.) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um runde Pellets mit einem Durchmesser von 2 bis 3 mm und einer Dicke von ca. 1 mm, die über einen Zeitraum von 90 Tagen kontinuierlich und gleichmäßig die eingearbeiteten Hormone freisetzen. Als Estrogenkomponente wurde 17 β -Estradiol (E₂) in einer Dosierung von 1,1 μ g/Tag, als Gestagenkomponente Medroxyprogesteronacetat (MPA) in einer Dosierung von 27,7 μ g/Tag gewählt. Die Wahl der Estrogendosis fiel dabei in Anlehnung an eine Veröffentlichung von Elhage et al. (Elhage *et al.*, 1997), die der Gestagendosis in Anlehnung an Veröffentlichungen von Hanke et al. (Hanke *et al.*, 1996) und Shultz et al. (Shultz *et al.*, 2004). Als Kontrolle wurden Plazebo-Pellets implantiert, um auszuschließen, dass beobachtete Effekte in Zusammenhang mit anderen Inhaltsstoffen der Pellets stehen oder durch den chirurgischen Eingriff bedingt sind. Zur Implantation wurde an der lateralen Seite des Nackens zwischen Ohr und Schulter ein kleiner Einschnitt mit einem Durchmesser von ca. 0,5 cm gemacht. Dort ist der Abstand zwischen Haut und Muskel groß, so dass das Risiko einer Beschädigung des Muskels und einer nachfolgenden Entzündung minimiert ist. Anschließend wurde subkutan eine Tasche mit einer Tiefe von ca. 1,5 cm geformt, in die das Pellet gelegt wurde. Abschließend wurden *Subcutis* und *Cutis* mit Einzelheften eines resorbierbaren Fadens der Stärke 4.0 (Johnson & Johnson, Norderstedt) verschlossen.

3.1.5 Lipidprofil

3.1.5.1 Gewinnung von plättchenarmem Plasma (PPP)

Nach intraperitonealer Anästhesie mit Ketamin 100 mg/kg und Xylazin 5mg/kg, i.p. wurde nach Freilegen des Herzens der rechte Ventrikel mit einer 1 ml-Spritze (Braun, Melsungen) punktiert (23G-Kanüle), um Vollblut zu gewinnen. Das Blut wurde mit 0,9 % NaCl (Braun, Melsungen)/0,1 M EDTA (Merck, Darmstadt) antikoaguliert und zur

Gewinnung von plättchenarmem Plasma zunächst für 15 Minuten bei 4 °C und 3.000 rpm, der Überstand anschließend für 5 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg). Das Plasma – in Form des Zentrifugationsüberstandes – wurde bis zur Bestimmung des Lipidprofils bei -20 °C gelagert.

3.1.5.2 Bestimmung des Lipidprofils im Plasma

Gesamtcholesterol- und Triglyzeridspiegel wurden mit kolorimetrischen Kits der Firma cobas (Roche Diagnostics, Mannheim) vom Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Düsseldorf bestimmt. Der Bestimmung des Gesamtcholesterins im Mäuse-Plasma liegt dabei die Spaltung der Cholesterinester unter Einwirkung von Cholesterinesterase in freies Cholesterin und Fettsäuren zugrunde. Das Cholesterin wird anschließend von Sauerstoff unter dem Einfluss von Cholesterinoxidase zu Cholest-4-en-3-on und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Prinzip der Quantifizierung der Plasmatriglyzeride ist eine vollständige Hydrolyse der Triglyzeride mit einer Lipoproteinlipase zu Glycerin, das anschließend zu Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid oxidiert wird. Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet in beiden Fällen mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol unter katalytischer Wirkung einer Peroxidase einen roten Farbstoff. Die Farbintensität des im Zuge der Messungen entstehenden Farbstoffes ist direkt proportional zur Cholesterin- bzw. Triglyzeridkonzentration und kann photometrisch gemessen werden.

3.1.6 Photochemisch induziertes laserbasiertes Thrombosemodell

3.1.6.1 Katheterisierung der Maus

90 Tage nach Pellet-Implantation wurden die Tiere gewogen und anästhesiert (Ketamin 100 mg/kg und Xylazin 5mg/kg, i.p.). Nachdem sie auf einem beheizten (37 °C) Präparationstisch fixiert worden waren, wurde das Fell im Bereich zwischen *papilla incisiva* und *musculus sternohyoideus* eröffnet und der Halsbereich der Maus durch einen ca. 1,5 cm langen Schnitt entlang der Körperachse eröffnet. Nach zwei weiteren, kleinen Einschnitten horizontal zur Körperachse wurde die linke *vena jugularis externa* durch stumpfes Präparieren freigelegt. Mit einer Fadenschlaufe (Stärke 6.0, Johnson & Johnson, Norderstedt) wurde die Halsvene zunächst distal der *vena facialis* ligiert. Ein Silikonschlauch (Länge ca. 20 cm) (BD, New Jersey, USA) mit einem Innendurchmesser von 0,28 mm wurde über eine 27G-Kanüle

gestülpt, die auf einer Spritze mit isotoner, steriler Kochsalzlösung (Braun, Melsungen) saß. Der Katheter wurde luftblasenfrei mit Kochsalzlösung (Braun, Melsungen) gefüllt. Anschließend wurde ein ca. 1 mm großes Loch in die *vena jugularis externa* geschnitten und der wie obenstehend beschrieben präparierte Katheter in die Halsvene gelegt. Mit einer zweiten Fadenschlaufe wurde der Katheter im Gefäß fixiert. Die richtige Lage des Katheters wurde überprüft, indem unter einem Binokularmikroskop eine sehr geringe Menge der Kochsalzlösung in die Halsvene appliziert wurde, so dass das Blut – kurzzeitig sichtbar – durch die injizierte Kochsalzlösung verdrängt wurde. Im Anschluss an die Katheterisierung der Maus wurde die rechte *arteria carotis communis* stumpf frei präpariert.

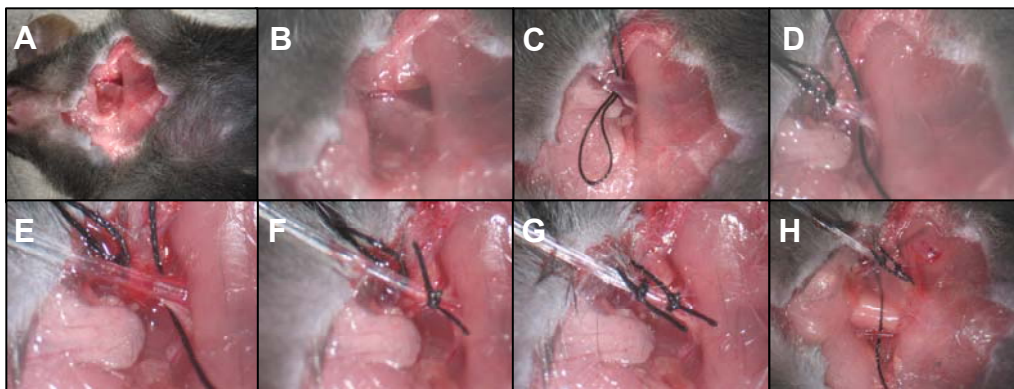


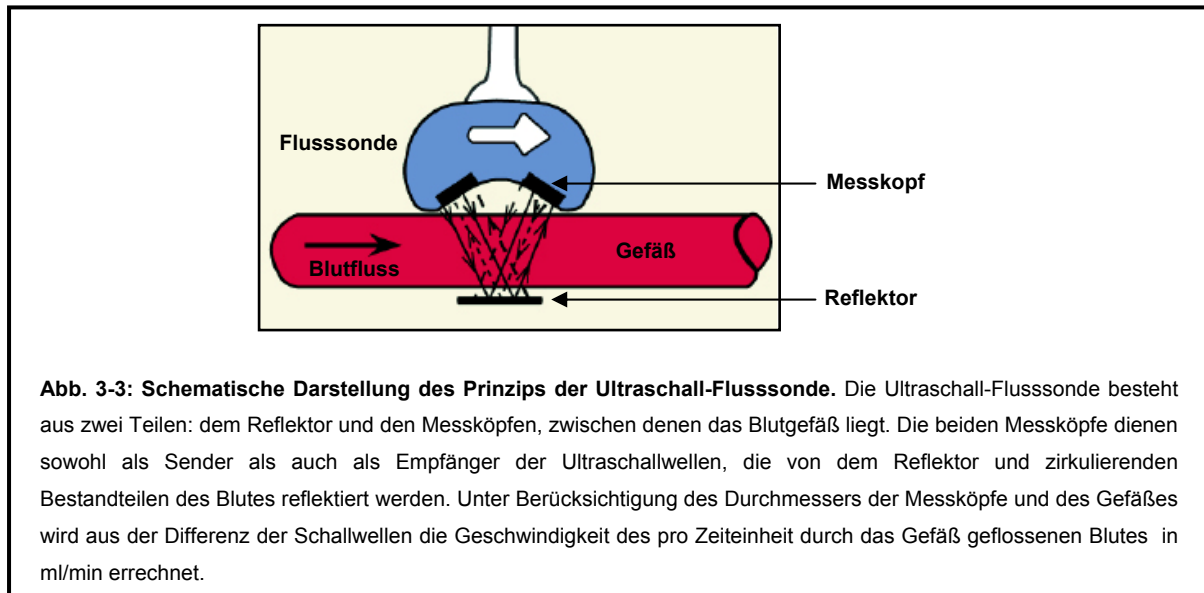
Abb. 3-2: Legen eines Venenverweilkatheters und Präparation der *arteria carotis communis*. (A) Nach Eröffnen des Halsbereiches, wird (B) die Halsvene frei präpariert und (C) eine Fadenschlaufe unter das Gefäß gelegt. (D) Die linke *vena jugularis externa* wird nach oben hin ligiert und in die Vene wird ein kleines Loch geschnitten. (E) In dieses Loch wird der Katheter geschoben, (F) unten und (G) oben ligiert. (H) Abschließend wird die *arteria carotis communis* frei präpariert.

Der Farbstoff Rose Bengal (Acros Organics, New Jersey, USA) wurde in sterilem 1x PBS zu 20 mg/ml gelöst. Die mit Kochsalzlösung gefüllte Spritze wurde vorsichtig und luftblasenfrei durch eine mit Rose Bengal gefüllte Spritze ersetzt.

3.1.6.2 Platzieren der Flusssonde und Einstellen des Lasers

Vor der Carotisverzweigung wurde mikrochirurgisch eine Ultraschall-Sonde (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) unter das Gefäß gelegt. Die Größe des Messkopfes wurde entsprechend dem Durchmesser des Gefäßes gewählt. Die Ultraschallblutflussmessung beruht auf dem Doppler-Prinzip. Zelluläre Bestandteile des Blutes reflektieren die Ultraschallwellen. Bei bekanntem Durchmesser der

Flussmessköpfe errechnet sich aus der Überlagerung der Schallwellen das Volumen des pro Zeiteinheit durch das Gefäß geflossenen Blutes in ml/min. Das Gebiet um die Carotisarterie und die Flusssonde wurde dauerhaft feucht gehalten, um eine einwandfreie Messung durch die Sonde zu garantieren.

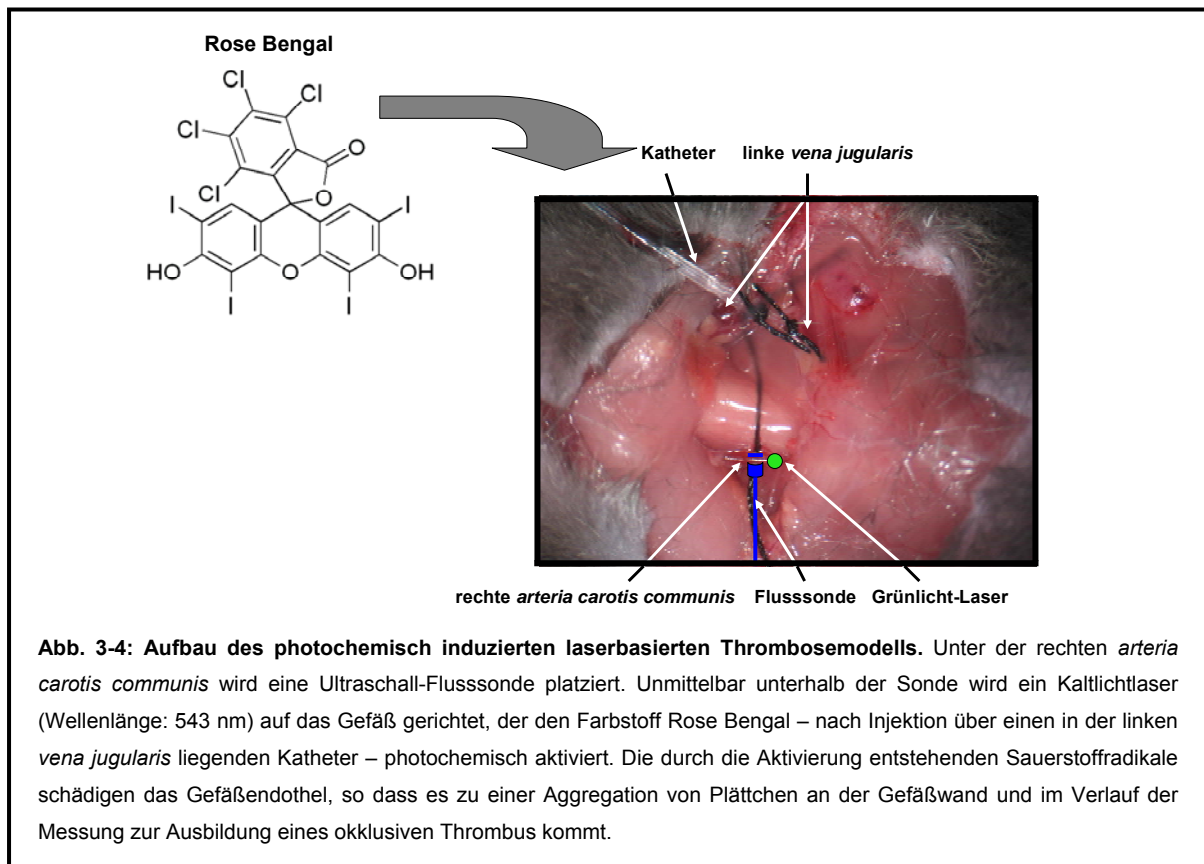


Nach Beginn der Aufzeichnung des basalen Blutflusses wurde ca. 2 mm distal zur Flusssonde und in einem Abstand von 6 cm zur *arteria carotis communis* ein Kaltlicht-Laser (Wellenlänge: 543 nm) (Melles Griot, Carlsbad, CA, USA) so platziert, dass die Carotisarterie vollständig von dem Laser bestrahlt wurde (Abbildung 3-4, S. 35).

3.1.6.3 Die Messung

Nachdem sich ein stabiler Fluss eingestellt hatte, wurden langsam und gleichmäßig über einen Zeitraum von ca. 1,5 bis 2 Minuten 50 mg Rose Bengal/kg Körpergewicht durch den Katheter appliziert. Die Mäuse wurden alle 20-30 Minuten mit Ketamin und Xylazin (100 mg/kg und 5 mg/kg, i.p.) re-anästhesiert, damit für den gesamten Zeitraum der Messung eine ausreichende Narkosetiefe sichergestellt war. Der Blutfluss wurde detektiert, bis sich eine stabile Okklusion nach Thrombosierung der *arteria carotis communis* zeigte (kein Blutfluss mehr). *Per definitionem* wird eine Okklusion von mehr als 10 Minuten als stabil bezeichnet. Nach stabiler Okklusion der Carotisarterie, spätestens aber 120 Minuten nach Ende der Rose Bengal-Injektion, wurde die Messung gestoppt. Jeden Tag wurden 3 Mäuse gemessen. Die

Messungen erfolgten so, dass eine gleiche Anzahl von Tieren aus den jeweiligen Gruppen zu den verschiedenen Messzeitpunkten gemessen wurde, um Unterschiede in Hinblick auf die Thrombusentstehung durch die Zirkadianrhythmik der Tiere auszugleichen.



3.1.6.4 Auswertung der Flussmessung

Für die Auswertung der Daten aus der Flussmessung wurde jeweils der Zeitraum von Beginn der Messung bis zur Beendigung der Rose Bengal-Injektion von (i) dem Zeitpunkt des Eintritts der ersten, initialen bzw. (ii) dem Zeitpunkt der stabilen Okklusion subtrahiert, um die Parameter (i) „Zeit bis zum Erreichen der ersten Okklusion“ und (ii) „Zeit bis zum Erreichen der stabilen Okklusion“ analysieren zu können. Darüber hinaus wurde die Häufigkeit dokumentiert, mit der sich der Blutfluss nach einer intermediären Okklusion wieder rekonstituierte. Die Analyse der Häufigkeit des Abreißens der initialen Plättchenthromben wurde im Zeitraum zwischen erster und stabiler Okklusion bestimmt. Ein Ereignis der „Rekonstituierung des Blutflusses“ wurde definiert als Wieder-Erreichen eines Blutflusses mit einer Geschwindigkeit von mehr als 0,09 ml/min nach intermediärer Okklusion. Die Summe

dieser Ereignisse im Zeitraum zwischen erster und stabiler Okklusion wurde als „Häufigkeit der Rekonstituierung des Blutflusses“ definiert.

3.1.7 FACS (*fluorescent activated cell sorting*) und ETP (*endogenes Thrombinpotential*)

3.1.7.1 Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP) zur Bestimmung der Plättchenaktivierung im FACS und von plättchenarmem Plasma (PPP) zur Bestimmung des ETPs

Vollblut wurde – wie unter 3.1.5 auf den Seiten 31 und 32 beschrieben – durch Punktion des Herzens gewonnen. Das Blut wurde – anders als unter 3.1.5 beschrieben – mit Natriumzitrat (Endkonzentration: 0.02 M) antikoaguliert. PRP wurde durch Zentrifugation des Vollbluts für 45 Sekunden bei 22 °C und 3000 rpm (Zentrifuge: 5415R, Eppendorf, Hamburg) gewonnen. 100 µl PRP (Zentrifugationsüberstand) wurden 1:10 mit 1x PBS verdünnt. Aus dem verbleibenden PRP wurde zur Bestimmung des endogenen Thrombinpotentials – wie unter 3.1.5 auf den Seiten 31 und 32 beschrieben – PPP gewonnen und bis zur Bestimmung des endogenen Thrombinpotentials bei -20 °C eingefroren.

3.1.7.2 FACS (*fluorescent activated cell sorting*)

Das Prinzip des FACS ist von L.A.Herzenberg *et al.* ausführlich beschrieben worden (Herzenberg *et al.*, 1976). Das FACS ist eine Methode zur Analyse und Aufbereitung von Einzelzellen in Suspension aufgrund von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften.

Lichtstreuung ist ein physikalischer Prozess, bei dem ein Partikel (Zelle) mit Licht interagiert. Dabei wird nur die Richtung, nicht die Wellenlänge (Farbe) des anregenden Lichtes verändert. Zelleigenschaften, die die Lichtstreuung beeinflussen, sind Zellgröße, Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile. So erlaubt das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) Aussagen über die ungefähre Zellgröße, während das Seitenstreulicht (*Side Scatter*, SSC) Informationen über die Zellgranularität und -komplexität gibt.

Fluoreszenz ist das durch Strahlung angeregte Leuchten eines Stoffes. Fluoreszierende Verbindungen absorbieren Lichtenergie in einem für sie charakteristischen Wellenlängenbereich und heben dabei Elektronen in ein höheres Energieniveau. Beim Zurückfallen der Elektronen auf das Grundniveau emittiert jedes

Elektron ein Photon. Diese Lichtemission wird als Fluoreszenz bezeichnet. Fluoreszenzmarkierte Einzelzellen werden in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl durch einen oder verschiedene Laserstrahlen geführt. Die dabei emittierten unterschiedlichen Lichtsignale werden mit Hilfe mehrerer Photovervielfältigerröhren (*Photomultiplier tubes*, PMT) in elektronische Signale verwandelt und gespeichert. Dazu werden jeweils die Impulshöhen der einzelnen Parameter bestimmt, digitalisiert und die resultierenden Werte einem Computer zur Korrelation und quantitativen Auswertung übertragen.

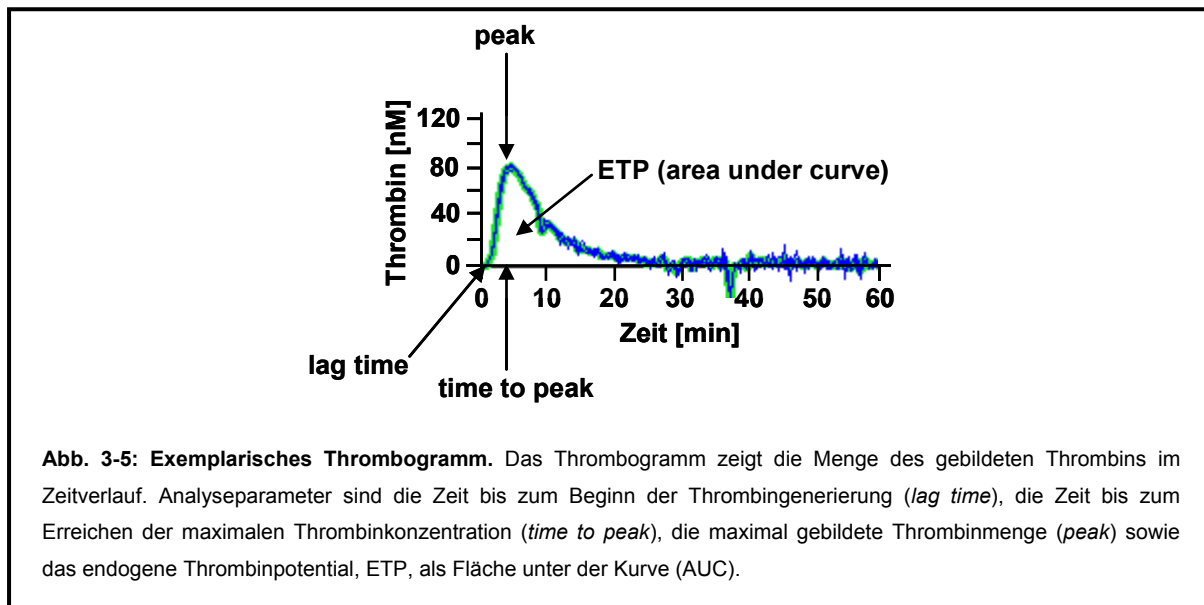
3.1.7.3 Bestimmung der Plättchenaktivierung im FACS

Für die Bestimmung des Gehalts an Plättchen im PRP wurden 25 µl PRP mit 5 µl eines mit Phycoerythrin (PE) konjugierten Ratte-anti-Maus-anti-CD41-Antikörpers (BD, Heidelberg) oder der entsprechenden mit PE konjugierten Maus-IgG1-Isotypkontrolle (Beckmann Coulter, Krefeld) für 30 Minuten bei 22 °C inkubiert. Zur Charakterisierung der P-Selektin (CD62P)-Expression als Marker für die basale Plättchenaktivierung wurden 25 µl PRP mit 5 µl eines mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugierten Ratte-anti-Maus-anti-CD62P-Antikörpers (BD, Heidelberg) oder der entsprechenden mit FITC konjugierten Maus-IgG1 Isotypkontrolle (Beckmann Coulter, Krefeld) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messungen im Cytomics 500 FACS (Beckmann Coulter, Krefeld) erfolgten nach Zugabe von 500 µl Isoton. Um die basale Plättchenaktivierung von der Plättchen-Aktivierbarkeit abzugrenzen, wurden die Plättchen aus 50 µl PRP 5 Minuten mit 5 µg/ml Convulxin (Alexis, Enzo life sciences GmbH, Lörrach), dem Gift der Klapperschlange, aktiviert. Anschließend wurde – wie schon für die basale Plättchenaktivierung beschrieben – im FACS die CD62P-Expression bestimmt.

3.1.7.4 Evaluation des endogenen Thrombinpotentials

Thrombin steht am Ende der Gerinnungskaskade und führt durch die Spaltung von Fibrinogen zur Etablierung eines Thrombus. Die Halbwertszeit von Thrombin im Plasma beträgt nur wenige Minuten, weil es rasch von Antithrombin und anderen Plasmaproteinen irreversibel gebunden wird. Die Gesamtthrombinaktivität hängt somit zum einen von der maximalen Menge des Thrombins ab, die gebildet wird, zum anderen von der Dauer der Aktivität des gebildeten Thrombins. Im

Thrombogramm wird die Thrombinkonzentration (Menge des gebildeten Thrombins) über die Zeit (Verlauf der Koagulation) dokumentiert (s. Abbildung 3-5).



Im Thrombogramm wird die Fläche unter der Kurve (AUC) als endogenes Thrombinpotential (ETP) bezeichnet und beschreibt die maximal generierbare Thrombinmenge in einer Probe. Ein weiterer Parameter ist die Zeit bis zum Beginn der Thrombingenerierung, die sogenannte „*lag time*“. Diese Zeit ist gleichzusetzen mit der Gerinnungszeit, da ein Thrombus sich schon zu einem Zeitpunkt bildet, zu dem nur ca. 1 % des maximal generierbaren Thrombins gebildet worden sind. Wird also die Gerinnungs-/Blutungszeit alleine als Analyse-Parameter herangezogen, wird immer nur ein kleiner Teil der Homeostase in die Analyse mit einbezogen. Die Messung des ETPs erfolgte im 96-well-Format. 15 µl des – wie unter 3.1.7.1 auf Seite 36 beschrieben – gewonnenen PPPs wurden mit 10 µl Plättchenmembranen, Innovin [Endkonzentration: 1 pM (Dade-Behring, Marburg)], 55 µl 1x PBS und 20 µl Rekalzifizierungspuffer [20 mM HEPES, pH 7.35, 60 mg/ml BSA und 100 mM Ca²⁺ sowie dem fluorogenen Substrat Z-Gly-Gly-Arg-7-amino-4-methylcoumarin (Bachem, Weinheim)] inkubiert. Die Thrombingenerierung wurde für 60 Minuten in einem „Fluoroscanner Ascent Platten-Leser“ (Thermo Electron, Karlsruhe) aufgezeichnet.

3.1.8 Ausmaß der Atherosklerose und (Immun)histochemie

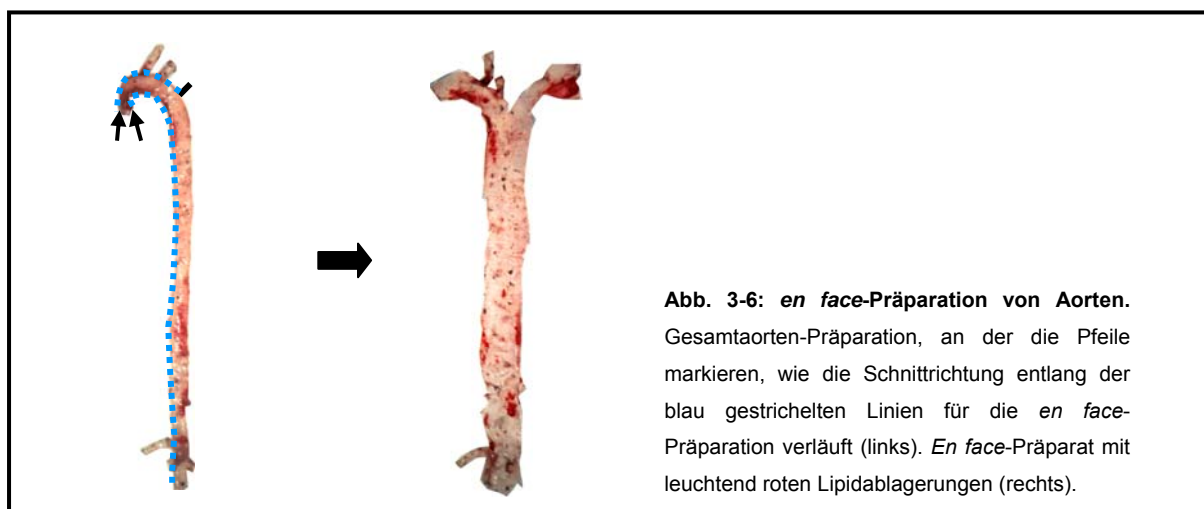
3.1.8.1 Perfusion und Entnahme von Aorta und Herz

Vor der Entnahme von Aorta und Herz wurden die Tiere in Narkose (Ketamin 100 mg/kg und Xylazin 5mg/kg, i.p.) mit 4 % Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt)

perfundiert. Nach Punktion des rechten Herzventrikels mit einer Schmetterlingskanüle wurden an den unteren Extremitäten beidseitig die Femoralarterien eröffnet, um einen Abfluss für die durch das Herz in das Gefäßsystem fließenden Fixativa zu generieren. Die Perfusion des Gefäßsystems erfolgte zunächst mit 10 ml 1x PBS zum Auswaschen des Blutes und nachfolgend mit 10 ml 4 % Paraformaldehyd zum Fixieren der Gefäße. Nach vorsichtigem Präparieren des Herzens und der Aorta wurde die Aorta unmittelbar oberhalb des Herzens und unterhalb beider Nierenabgänge abgetrennt. Die *arteria brachiocephalica* wurde vom Aortenbogen getrennt; *arteria carotis communis* und *arteria subclavia* blieben intakt am Aortenbogen bestehen. Herz und Aorta wurden für 4 Stunden bei Raumtemperatur in 4 % PFA fixiert. Während die Aorta in 4 % PFA verblieb, wurde das Herz in 20 %-ige Succhrose-Lösung überführt und anschließend wurden beide Gewebe für 12 – 16 h bei 4 °C gelagert.

3.1.8.2 Öl-Rot-O-Färbung von Lipidablagerungen in Aorten

Die Aorten wurden in 1x PBS überführt und durch vorsichtiges Präparieren von Resten der Adventitia und Fett befreit. Die Anfärbung von Lipiddepositionen erfolgte mit Öl-Rot-O (Sigma, Steinheim), einem Lysochrom-Diazofarbstoff. Hierzu wurden die Aorten zunächst 5 Minuten in 78 % Methanol (Merck, Darmstadt) gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte die Färbung für 90 Minuten in 900 µl Öl-Rot-O-Färbelösung (700 µl Öl-Rot-O, 200 µl 1 M NaOH). Abschließend wurden die Aorten zum Auswaschen von Hintergrundfärbung 10 Minuten in 78 %-igem Methanol gewaschen. Durch die Färbung sichtbar gewordene Adventitia-Reste wurden sorgfältig entfernt und die Aorta wurde aufgeschnitten.



Die so präparierte Aorta wurde in einer Petrischale aufgefaltet. Aufnahmen der *en face*-Präparationen dienten nachfolgend dazu, das Ausmaß der Atherosklerose bestimmen zu können.

3.1.8.3 Bestimmung des Plaquebesatzes

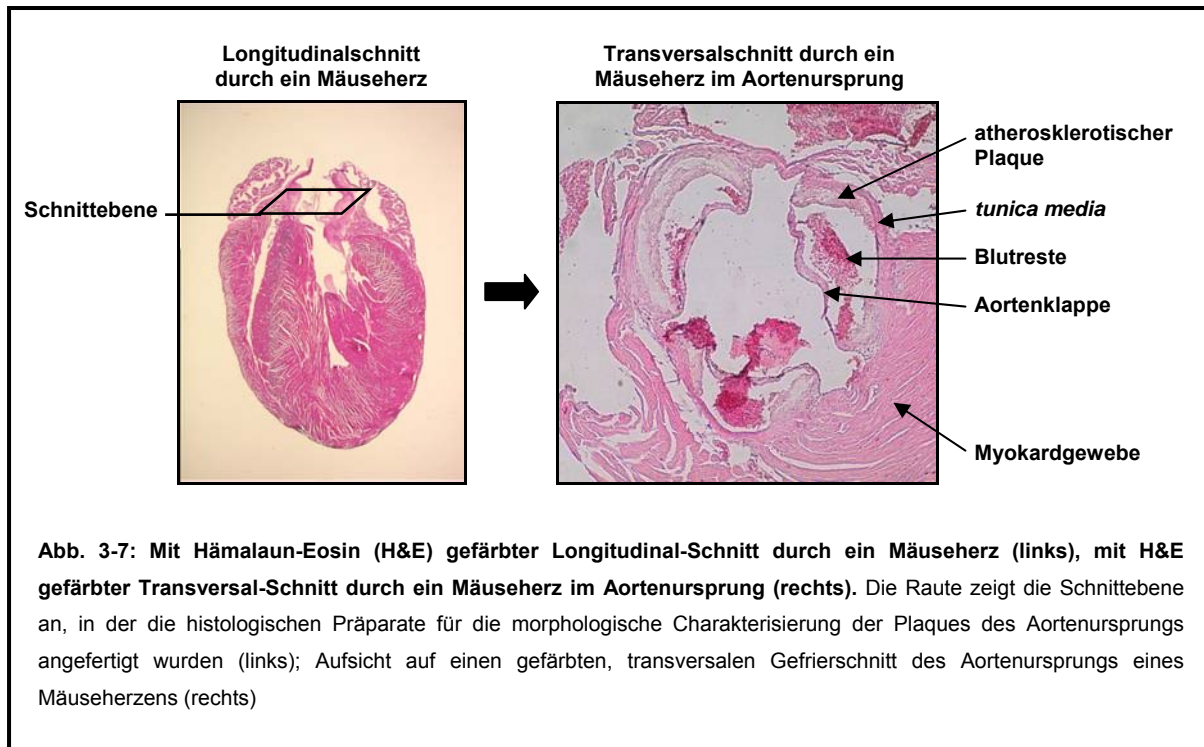
Als Parameter für die Bestimmung des Ausmaßes der Atherosklerose wurde der Besatz der Aorta mit Lipiddepositionen (Plaquescore) quantifiziert. Der Plaquebesatz wurde mit Hilfe der NIH-Freeware ImageJ 1.37 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte im 8-bit Graustufenmodus. Die rot gefärbte Fläche wurde durch Festsetzung eines Schwellenwertes markiert, der so gewählt wurde, dass er spezifisch gefärbte Bereiche maximal detektierte, während Hintergrundsignale gleichzeitig minimiert wurden. Der Plaquescore wurde als prozentualer Anteil der Summe der durch Öl-Rot-O gefärbten Plaqueflächen in Bezug auf die Gesamtfläche der Aorta bestimmt. Plaques in der *arteria carotis communis*, der *arteria subclavia* und den Nierenabgängen wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

3.1.9 Plaquemorphologie – (Immun)histochemie

3.1.9.1 Kryokonservierung von Herzen und Anfertigung von Gefrierschnitten

Von den in 20 %-iger Succhrose-Lösung gelagerten Herzen wurde der Apex entfernt, um eine glatte Schnittfläche zu generieren. Die so präparierten Herzen wurden mit der Schnittfläche zum Boden in mit Tissue Tek[®] Medium (Sakura Finetak, Staufen) befüllte Lab Teks[™] (Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) überführt. Für die Kryokonservierung wurde 2-Butanol (Merck, Darmstadt) in Flüssigstickstoff auf -40 °C heruntergekühlt und die Lab Teks[™] wurden mit den Herzen anschließend in Isopentan getaucht, bis das Tissue Tek[®] Medium weiß und fest geworden war. Die so konservierten Herzen wurden bei -80 °C gelagert.

Mit einem Leica-Kryostat (Leica, Bensheim) wurden aus den Herzpräparaten 14 µm dicke Gefrierschnitte des Aortenursprungs angefertigt, durch Warmluft auf Objektträgern vorfixiert und bis zur (immun)histochemischen Analyse bei -80 °C gelagert. Die morphologische Charakterisierung atherosklerotischer Ablagerungen erfolgte an Plaques des Aortenursprungs, der als der Bereich definiert ist, in dem die Aorta im linken Ventrikel in das Herz mündet. Hier herrschen starke strömungsbedingte Turbulenzen, so dass sich leichter atherosklerotische Ablagerungen bilden können als in Gebieten mit laminarem Blutfluss.



3.1.9.2 (Immun)histochemische Analyse von Gefrierschnitten des Aortenursprungs

Die morphologische Charakterisierung der Plaques des Aortenursprungs erfolgte hinsichtlich des Lipidgehaltes, der Invasion glatter Muskelzellen, der Retention von Makrophagen und der Akkumulation der Matrixkomponenten Hyaluronsäure und Kollagen. Je nach Färbung wurden die Präparate nach dem Auftauen mit 10 % Formalin (Lipide), eiskaltem Aceton (glatte Muskelzellen), 70 %-igem Ethanol (Kollagen) oder 100 %-igem Ethanol (Makrophagen, Hyaluronsäure) für 15 min bei 4 °C fixiert und anschließend 3 x 5 min mit 1x PBS gewaschen.

Zur Quantifizierung der Lipidakkumulation wurden die Schnitte des Aortenursprungs mit Öl-Rot-O (Sigma, Steinheim) gefärbt. Nach dem Fixieren und Waschen wurden die Schnitte in 100 %-iges Propylenglykol (Sigma, Steinheim) überführt und 5 min inkubiert. Anschließend wurden sie 8 min bei 60 °C im Trockenschrank mit Öl-Rot-O-Färbelösung (Appendix 1, Seite 158) inkubiert und nachfolgend 5 min in 85 %-igem Propylenglykol gewaschen. Die Kernfärbung erfolgte für 1 min in Hämalun (Merck, Darmstadt) mit nachfolgender, kurzer Differenzierung in 1 % HCl (Merck, Darmstadt) und dem Bläuen der Zellkerne für 10 min unter fließendem Leitungswasser. Das Bläuen wurde in ddH₂O abgestoppt und die Präparate wurden in Aquatex (Merck, Darmstadt) eingebettet. Für die Charakterisierung hinsichtlich des Gehaltes an glatten Muskelzellen, Makrophagen und Hyaluronsäure wurden die Gefrierschnitte

nach der Fixierung für 1 h bei 22 °C mit 10 % FCS/1 % BSA in 1x TBS blockiert. Der Gehalt glatter Muskelzellen in der fibrotischen Kappe der Plaques wurde über spezifische Färbung glattemuskulären α -Aktins mit einem rabbit-anti-mouse- α -SM-Aktin-Erstantikörper [1:50 in 1 % BSA/1x PBS, ü.N., 4 °C (abcam, UK)] und einem sheep-anti-rabbit-IgG-Cy3-Zweitantikörper [1:200 in 1x PBS, 1 h, 22 °C, (Sigma, Steinheim)] detektiert. Nach jeder der Antikörperinkubationen wurden die Schnitte jeweils 3 x 5 min mit 1x PBS gewaschen, um unspezifisch oder nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Makrophagenretention und Hyaluronsäureakkumulation wurden in einer Doppelfärbung analysiert. Hyaluronsäure wurde mit dem Hyaluronsäure-Binde-Protein [HAbP (Saikagaku, Japan), 2 μ g/ml in 1 % BSA/1x PBS, ü.N., 4 °C] und Streptavidin-FITC [1:200 in 1x PBS, 1 h, 22 °C (Dako, Hamburg)], nachfolgend das Makrophagen-Antigen mac2 mit einem rat-anti-mouse mac2 Erstantikörper [1:400 in 1 % BSA/1x PBS, 1 h, 22 °C (Cedarlane, Canada)] und einem RhodaminX-gekoppelten goat-anti-rat-IgG-Zweitantikörper [1:200 in 1x PBS, 1 h, 22 °C (Jackson Immuno Research, USA)] detektiert. Auch hier erfolgten nach jeder Antikörperinkubation 3 Waschschrte à 5 min mit 1x PBS. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit ProLong Gold/DAPI (invitrogen, Karlsruhe). Für die mikroskopische Dokumentation wurden die Präparate mit einem Deckgläschen und Nagellack eingedeckt.

Kollagen wurde mit Picro-Sirius-Rot (Sigma, Steinheim) angefärbt. Nach der Fixierung und dem anschließenden Waschen wurden die Schnitte 7 min mit Celestinblau [(Sigma, Steinheim), Appendix 1, Seite 158] gefärbt und anschließend kurz in 1 % HCl differenziert; das Bläuen der Kerne erfolgte für 10 min unter fließendem Leitungswasser. Anschließend wurden die Gefrierschnitte 15 Minuten in Picro-Sirius-Rot-Lösung (Appendix 1, Seite 158) inkubiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1 x 2 min. 70 % EtOH, 1 x 2 min 95 % EtOH, 1 x 2 min EtOH abs.) dehydriert und abschließend 1 x 5 min in Xylol (Merck, Darmstadt) gewaschen, bevor sie mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt wurden. Die Packungsdichte des Kollagens wurde unter polarisiertem Licht evaluiert.

3.1.9.3 Dokumentation und quantitative Analyse der immunhistochemischen Färbungen

Von allen Färbungen wurden mit einem BX-50 Mikroskop (Olympus, Hamburg) und einer ColorViewII Kamera 40-fache Vergrößerungen aufgenommen. ImageJ 1.37

(National Institutes of Health, USA) wurde verwendet, um die Aufnahmen in Bilder mit 8-bit Farbtiefe zu konvertieren. Anschließend wurde für die einzelnen Färbungen jeweils ein Basiswert definiert, der eine Interferenz mit unspezifischer Hintergrundfärbung minimierte und gleichzeitig die Auswahl spezifisch gefärbter Areale maximierte. Dieser Basiswert wurde bei der Analyse aller Bilder einer Färbung konstant gehalten. Um die unterschiedlichen Färbungen quantitativ auszuwerten, wurde die Fläche des – anhand des Basiswertes als spezifisch gefärbt definierten – Bereiches als prozentualer Anteil der Gesamt-Plaquerfläche ausgegeben. Anschließend wurde die Fläche mit der mittleren Intensität der Pixel in diesem markierten Bereich multipliziert. In den einzelnen Gruppen wurden die Ergebnisse von mindestens fünf Tieren gemittelt.

3.1.10 Analyse der Endothelfunktion

3.1.10.1 Entnahme der Aorta

Nach Töten durch CO₂-Inhalation wurden die Mäuse rücklings auf einem Präparationstisch fixiert. Das Fell wurde entfernt und anschließend der Thorax nach Durchtrennung des kaudalen Anteils des *Corpus sterni* und der Rippen eröffnet. Lunge und Ösophagus wurden entnommen und die Bauchhöhle wurde bis zum Zwerchfell geöffnet. Das Zwerchfell wurde durchtrennt und die inneren Organe wurden nach außen exponiert. Nach Durchtrennung der Aorta an ihrem Ursprung aus dem linken Ventrikel und Lösen des sie umgebenden Gewebes wurde die thorakale Aorta in ihrer gesamten Länge vorsichtig entnommen. Das Gefäß wurde in eine Petrischale mit Krebs-Hepes-Puffer (Appendix 1, Seiten 158 und 159) überführt und durchspült, um das Gefäßlumen von Blutresten zu reinigen. Anhaftendes Binde- und Fettgewebe wurden mit Pinzette und Schere vorsichtig entfernt. Die thorakale Aorta wurde zur Durchführung von Organbadversuchen in 5 mm große Stücke geschnitten. Je Tier wurden zwei Aortenringe untersucht.

3.1.10.2 Untersuchung isolierter Aortenringe im Organbad

Zur Untersuchung der vaskularen Reaktivität isolierter, thorakaler Aortenringe wurde eine Apparatur benutzt, die aus vier einzelnen Messstationen mit je einem doppelwandigen, 20 ml fassenden Glasgefäß bestand. Die Glasgefäße wurden für die Versuche mit je 10 ml Krebs-Henseleit-Puffer (Appendix 1, Seiten 158 und 159) befüllt, der über Glasfritten mit Carbogen (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlenstoffdioxid)

begast wurde. Der Puffer wurde über eine Warmwasserversorgung zwischen den Doppelwänden konstant auf 37 °C temperiert. Ein doppelwandiger Zylinder, der ebenfalls an den Warmwasserkreislauf angeschlossen wurde, diente als Vorratsgefäß für vorgewärmten Puffer. Die Messapparatur wurde vor jedem Versuch mit genormten Gewichten geeicht. Bei den Versuchen wurde der Nullwert bei einer Vorspannung von 1 g (Belastung der Kraftaufnehmer mit genormten Gewichten von 1 g) eingestellt. Für die weitere Belastung mit jeweils 1 g entsprach der zugehörige Schreiberausschlag einer Strecke von 3 cm. Dies ermöglichte eine spätere Auswertung der registrierten Kurven bezüglich der Kraftentwicklung in Newton. Die Aortenringe wurden vorsichtig, ohne das Endothel zu beschädigen, im Organbad fixiert. Dazu wurden sie zwischen zwei triangelförmige „Elemente“ aus Edelstahl eingespannt, wobei das untere Element an einer Haltestange, das obere über einen Polyesterfaden an einem isometrischen Kraftaufnehmer befestigt war. Die Organe waren während des Versuches immer vollständig von der begasten Pufferlösung umspült. Die Veränderungen des Vasotonus wurden über einen Verstärker registriert und auf einem Flachbrettschreiber aufgezeichnet. Die Ruhespannung der Aorten wurde durch Spannung des Fadens mittels einer Mikrometerschraube auf den Nullwert des Schreibers eingestellt, so dass sie einer Belastung von 1 g entsprach (Abbildung 3-8, Seite 45).

Untersuchungen im Organbad wurden in der folgenden Reihenfolge durchgeführt:

Äquilibrierungsphase

Während der Äquilibrierungsphase von ca. 60 Minuten wurde die gewählte Vorspannung immer wieder eingestellt, bis sich der Vasotonus der Aortenringe nicht mehr spontan veränderte. Der Puffer wurde alle 20 Minuten gewechselt.

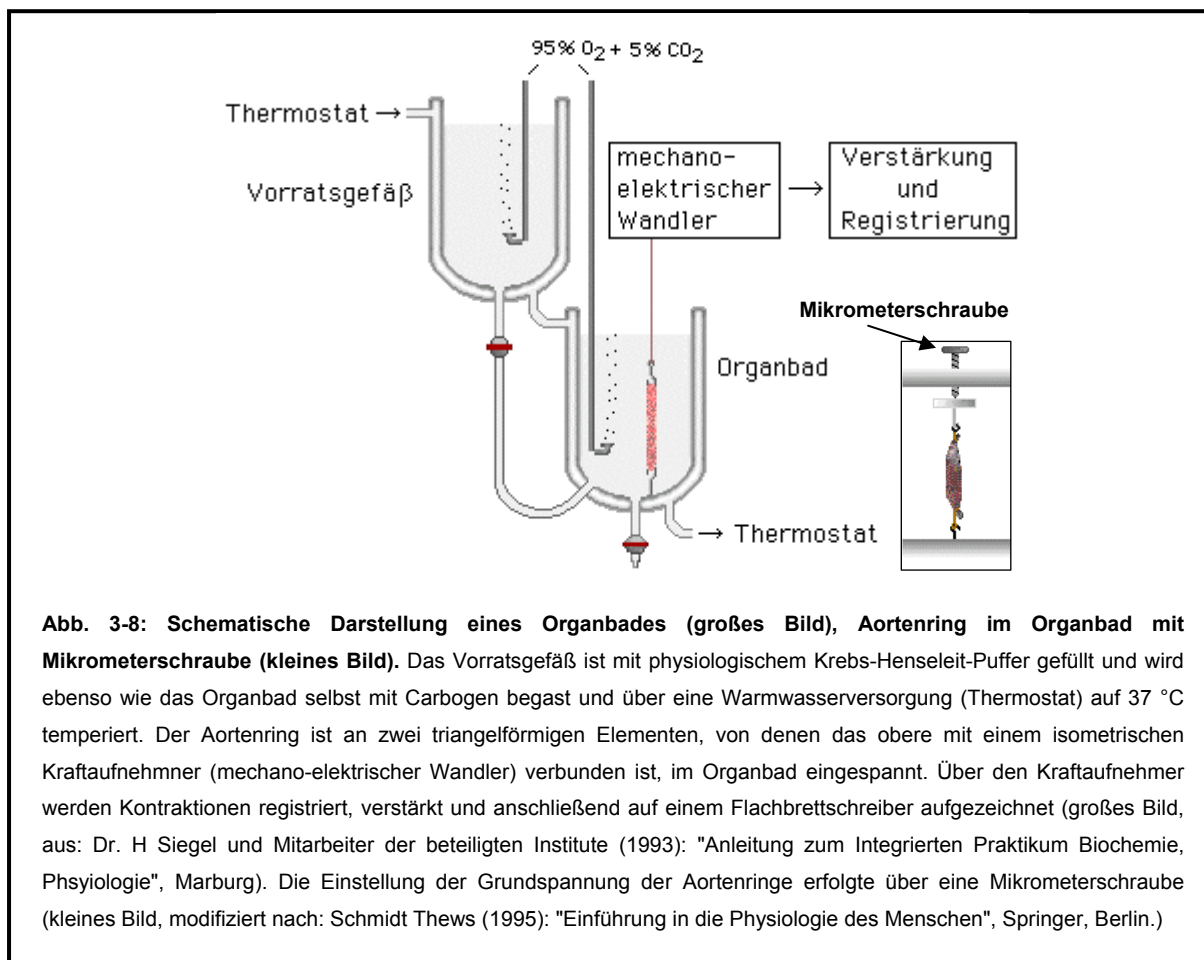
Kontraktionstest mit Kaliumchlorid

Zur Überprüfung der Funktionalität der Gefäße wurde das Kontraktionsverhalten der Aortenringe nach Depolarisation mit 80 mM KCl (Merck, Darmstadt) über einen Zeitraum von 20 min analysiert. Nach vollständiger Relaxation der Aortenringe durch dreimaliges Auswaschen der Pufferlösung mit je 10 ml Krebs-Henseleit-Puffer wurde die Vorspannung erneut eingestellt und der Kontraktionstest mit 80 mM KCl ein zweites Mal durchgeführt.

Vorkontraktionen mit 10 μM bzw. 0,3 μM Phenylephrin

Die Stimulation von α_1 -Rezeptoren führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C. Die Hydrolyse von membrangebundenen Polyphosphoinositiden durch die Phospholipase C führt zur Produktion von zwei „Botenstoffen“: Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3). DAG aktiviert die Proteinkinase C, IP_3 führt zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung. Dies führt bei fast allen Geweben mit glatter Muskulatur – mit Ausnahme des Gastrointestinaltraktes – zu einer Kontraktion. Im Zuge der Etablierung der Methode stellte sich heraus, dass eine zufriedenstellende durch α_1 -Adrenorezeptoren vermittelte Kontraktion der Aortenringe durch zwei Vorkontraktionen mit 10 μM (maximale Konzentration) Phenylephrin (Sigma, Steinheim) und 0,3 μM Phenylephrin erreicht werden konnte.

Nach jeder der beiden Vorkontraktionen wurde nach Erreichen eines Kontraktions-Plateaus das System 3x mit je 10 ml Krebs-Henseleit-Puffer ausgewaschen, bis die Gefäße wieder ihren Grundtonus erreicht hatten. Erreichten sie diesen nicht, wurden sie mit Hilfe der Mikrometerschrauben auf ihre Ausgangsspannung justiert.



Endothelabhängige Relaxation

Die endogene NO-Wirkung, die von der Intaktheit des Endothels abhängt, kann durch Evaluation der endothelabhängigen Relaxation getestet werden. Acetylcholin bewirkt über Aktivierung von M3-Rezeptoren auf der Endothelzelloberfläche eine Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS). Die eNOS setzt L-Arginin zu L-Citrullin und NO[•] um, das in die Media diffundiert und eine Vasorelaxation auslöst. Die Analyse der Endothelfunktion erfolgte nach Vorkontraktion mit 0,2 µM Phenylephrin und anschließender kumulativer Gabe von Acetylcholin (1 nM – 10 µM) (Sigma, Steinheim). Die Folgedosis wurde jeweils nach Erreichen eines Plateaus gegeben. Nach Erreichen des maximalen Relaxationsplateaus mit 10 µM Acetylcholin wurde das System 3x mit je 10 ml Krebs-Henseleit-Puffer (Appendix 1, Seiten 158 und 159) ausgewaschen, bis die Gefäße wieder ihren Grundtonus erreicht hatten. Entsprechend dieser nicht der Nullspannung, wurde der Tonus mit Hilfe der Mikrometerschrauben auf die Nullspannung gesetzt.

Kontraktionstest mit Phenylephrin

Zur Kontrolle der durch Phenylephrin ausgelösten Kontraktion wurde die Substanz kumulativ (1 nM – 10 µM) ins Organbad gegeben, wobei die Folgedosis jeweils nach Erreichen eines Kontraktionsplateaus gegeben wurde.

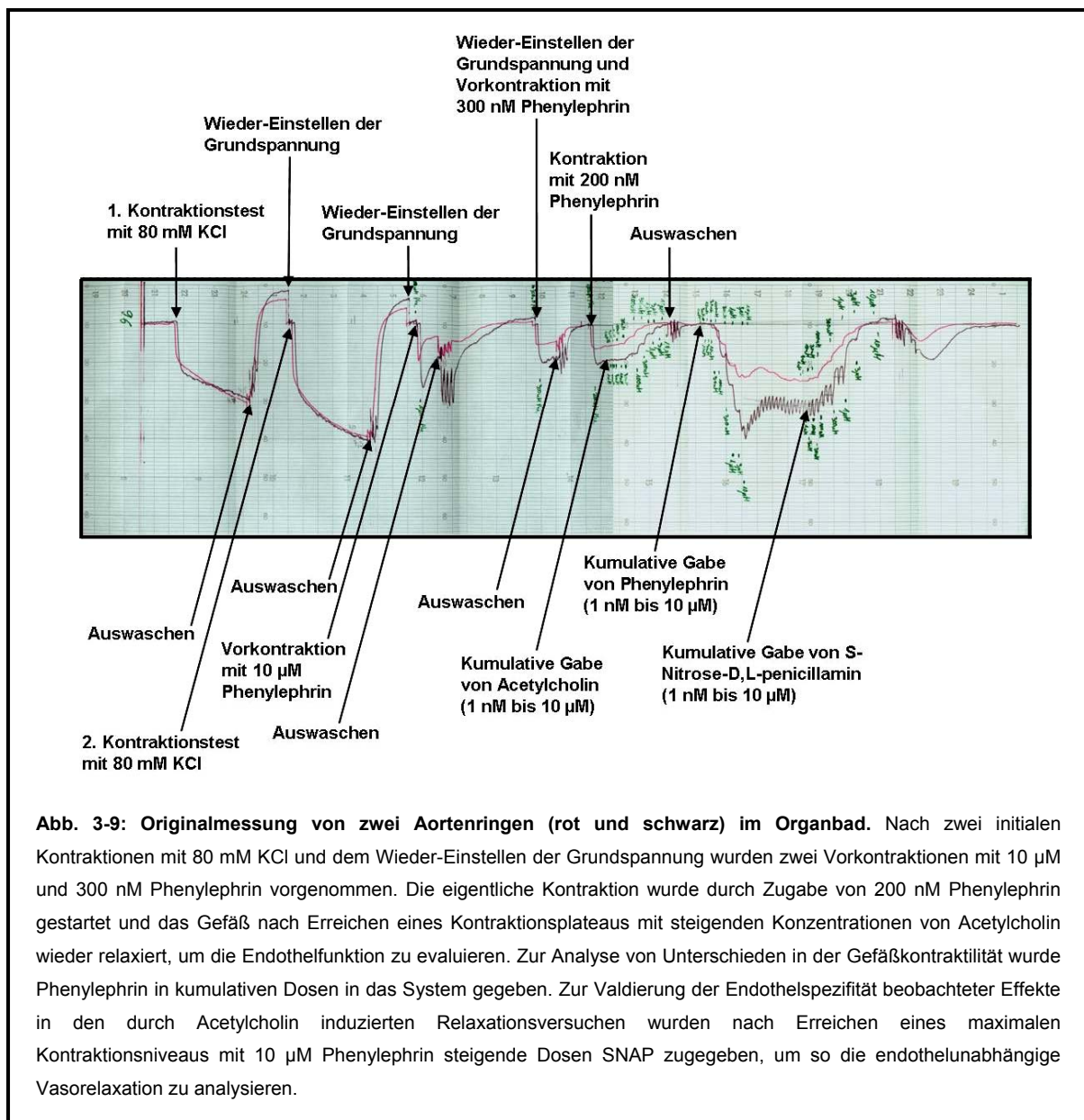
Wirkung des NO-Donors S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin, SNAP, (endothelunabhängige Relaxation)

SNAP ist ein Nitrosothiol-Derivat und bildet unter physiologischen Bedingungen spontan Stickstoffmonoxid (NO[•]). Wegen seiner Eigenschaft, spontan NO freizusetzen, ist SNAP ein potenter Vasodilator, unabhängig von der Aktivität der endothelialen NO-Synthase.

Die Evaluation der tatsächlichen Endothelabhängigkeit der – durch Acetylcholin induzierten – Vasorelaxation erfolgte nach Erreichen eines stabilen Kontraktionsniveaus mit der maximalen Dosis von 10 µM Phenylephrin aus dem vorstehend beschriebenen Kontraktionstest durch Zugabe des NO-Donors SNAP in steigenden Dosen (1 nM – 10 µM) ins Organbad. Die Folgedosis wurde dabei, wie schon für Acetylcholin beschrieben, jeweils nach Erreichen eines Relaxationsplateaus gegeben.

3.1.10.3 Anfertigung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Zur Anfertigung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurde im Anschluss an die endothelabhängige Relaxation eine Gerade vom Plateau der Grundspannung nach dem Auswaschen zur Nullspannung vor der Kontraktion mit 0,2 μM Phenylephrin gezogen. In den Fällen, in denen die maximale Relaxation bei höchster Acetylcholkonzentration über der gezogenen Gerade lag, wurde das maximale Relaxationsplateau oberhalb der Geraden als Ausgangspunkt für die Gerade gewählt und nicht das Plateau nach dem Auswaschen.



3.2 Zellversuche

3.2.1 Zellkultur

Vaskuläre, glatte Gefäßmuskelzellen (VSMCs) wurden in "VSMC growth medium" (Promocell, Heidelberg), das mit 10 % fetalem Kälberserum (Pan Biotech, Aidenbach) und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (invitrogen, Karlsruhe), 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren (invitrogen, Karlsruhe) und 2 mM L-Glutamin (invitrogen, Karlsruhe) supplementiert wurde, kultiviert. Die Zellen wurden als subkonfluenter *Monolayer* bei 37 °C und 5 % CO₂ in feuchter Atmosphäre gehalten. Zur fortwährenden Kultivierung wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom, Berlin) vom Kulturschalenboden gelöst. Die Trypsinierung wurde nach 10 min mit "VSMC growth medium" gestoppt und die Zellsuspension für 5 min bei 1.100 rpm zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0, Thermo Scientific, Karlsruhe). Das Pellet wurde in frischem "VSMC growth medium" resuspendiert, die Zellen in einer Neubauer-Kammer gezählt. Für die Versuche wurden VSMC (Passagen 7 – 12) in einer Dichte von 5.000 Zellen/cm² in 6-Loch-Platten ausgesät. Für Stimulationsversuche wurden die VSMC 24 h nach der Aussaat für 24 h durch Serumentzug synchronisiert. Die Stimulation erfolgte mit 10 ng/ml PDGF-BB alleine oder in Kombination mit 1 nM bzw. 100 nM Estradiol (Sigma, Steinheim) für 24 Stunden. Zur Evaluation einer Estrogenrezeptorabhängigkeit wurden die VSMC vor der Stimulation für eine Dauer von 30 Minuten mit 10 µM des Estrogenrezeptor α- und β-Antagonisten ICI182780 (Tocris, USA) vorinkubiert.

3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur analytischen Trennung von Proteingemischen wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970) angewandt. Die chemisch stabilen und inerten Polyacrylamidgele entstehen in einer radikalischen Kettenreaktion durch Kopolymerisation von Acrylamid-Monomeren mit N, N'-Methylenbisacrylamid.

Tab. 3-1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

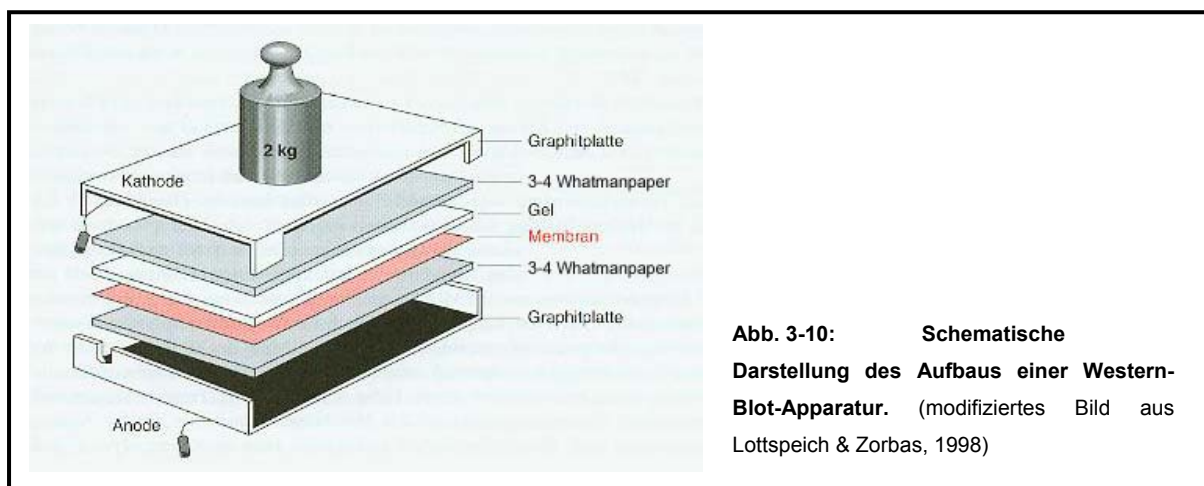
Trenngel (12 %-ig):	1x
ddH ₂ O	6,500 ml
40 %-ige Acrylamidlösung	5,500 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	3,750 ml
10 %-ige SDS-Lösung	0,150 ml
10 %-ige APS-Lösung	0,150 ml
TEMED	0,015 ml

Sammelgel (5 %-ig):	1x
ddH ₂ O	6,525 ml
40 %-ige Acrylamidlösung	1,125 ml
1,0 M Tris, pH 6,8	1,125 ml
10 %-ige SDS-Lösung	0,090 ml
10 %-ige APS-Lösung	0,090 ml
TEMED	0,010 ml

Proteine wurden mit Zelllysispuffer (Appendix 1, Seiten 158 und 159) geerntet, vor der SDS-PAGE mit $\frac{1}{4}$ Probenvolumen 4x Auftragspuffer (Appendix 1, Seiten 158 und 159) versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Die SDS-PAGE wurde initial bei 120 V, nach Einlaufen der Proben in das Sammelgel bei 160 V, durchgeführt. Als Größenstandard wurden je Gel 3 μ l „*Pre-stained Protein Molecular Weight*“-Marker (fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen.

3.2.3 Western-Blot

Burnette stellte 1981 den elektrophoretischen Transfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf Nitrozellulose-Membranen als Western-Blot vor (Burnette, 1981). Man unterscheidet den *semidry-Blot* (erstmal von Kyhse-Anderson 1984 beschrieben), bei dem die Proteine horizontal auf eine Membran transferiert werden, vom *Tank-Blot*, bei dem eine vertikale Übertragung stattfindet (Kyhse-Andersen, 1984). Für die Experimente erfolgte der Transfer der Proteine in einem *semidry-Blot* und wurde gemäß Abbildung 3-10 vorgenommen.



Die Whatmanpaper und die Nitrozellulose-Membran wurden vor dem Blot in Transfer-Puffer getränkt. Über das senkrecht zum Gel angelegte elektrische Feld wurden die Proteine bei einer Spannung von 12 Volt auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden nach dem Transfer durch schüttelnde Inkubation für 1 h bei 22 °C in 3 % BSA/TBST abgesättigt. Als Erstantikörper wurden rabbit-anti-human-p42/44-MAPK- und rabbit-anti-human-p-(T202/Y204)-p42/44-MAPK-Antikörper (cell signaling, USA) in einer Verdünnung von 1:1.000 in 1x TBST über Nacht bei 4 °C eingesetzt. Die

Ladungskontrolle mouse-anti-human- β -Tubulin (Santa Cruz, USA) wurde in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt und am folgenden Tag für eine Stunde bei 22 °C mit den p42/44 MAPK- bzw. p-p42/44-MAPK(T202/Y204)-Antikörpern und der Membran inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschrte à 5 min in 1x TBST. Die Erstantikörper wurden durch einstündige Inkubation mit Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörpern (goat-anti-rabbit-IRDye800CW und donkey-anti-mouse-IRDye680, Li-Cor, USA) detektiert und mittels des Li-Cor Odyssey analysiert.

3.2.4 Immunzytochemie

Vor der Färbung der perizellulären HA-Matrix wurden VSMC in einer Dichte von 5.000 Zellen/cm² auf Deckgläschen (Ø: 18 mm) ausgesät und anschließend wie unter 3.2.1 auf Seite 48 beschrieben, stimuliert. 24 Stunden nach der Stimulation wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend für 20 min bei 22 °C mit 5 % Essigsäure (Merck, Darmstadt), 70 % Ethanol (Merck, Darmstadt) und 3,7 % Formalin (Merck, Darmstadt) in 1x PBS fixiert. Darauf folgend wurden die Zellen 3 x 5 min mit 1x PBS gewaschen und anschließend eine Stunde bei 22 °C in 3 % FCS/1x PBS blockiert. Hyaluronsäure wurde mit dem Hyaluronsäure-Binde-Protein [HAbP (Saikagaku, Japan), 2 µg/ml in 1 % FCS/1x PBS, 1 h, 22 °C] und Streptavidin-FITC [1:200 in 1x PBS, 1 h, 22 °C (Dako, Hamburg)] detektiert. Die Kernfärbung wurde mit Hoechst 33324 [1:1.000 in 1x PBS, 3 min, 22 °C (Invitrogen, Karlsruhe)] durchgeführt. Die Deckgläschen wurden anschließend auf einem Objektträger mit *Vectashield mounting medium* (Linaris, Wertheim) eingedeckt. Bilder wurden unter Verwendung von Immersionsöl [ImmersolTM 518F (Zeiss, Oberkochen)] mit einem 40x Öl-Objektiv an einem Zeiss AxioObserver Z1-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) aufgenommen.

3.2.5 Gesamt-RNA-Isolation aus Zellen und Messung der RNA-Konzentration

Nach Absaugen des Mediums wurde 1 ml TriReagent (Sigma, Steinheim) in jedes *well* gegeben und 10 min bei 22 °C mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurde die TriReagent-Zell-Suspension 10 min ruhend bei 22 °C und weitere 10 min bei 13.000 rpm und 22 °C mit 200 µl Chloroform (Merck, Darmstadt) extrahiert. Die wässrige Phase (mit der RNA) wurde in ein sauberes Eppendorf-Gefäß überführt und die RNA mit dem gleichen Volumen (1:1) Isopropanol (Merck, Darmstadt) für 10 min bei 22 °C und anschließend 45 min bei 13.000 rpm und 4 °C präzipitiert. Der Überstand wurde

verworfen und das RNA-Pellet mit 500 µl absolutem Ethanol 15 min bei 13.000 rpm (Zentrifuge: 5415R, Eppendorf, Hamburg) und 4 °C gewaschen. Das RNA-Pellet wurde bei 22 °C luftgetrocknet und anschließend in 15 µl RNase-freiem ddH₂O resuspendiert, 5 min bei 65 °C gelöst und bei -80 °C gelagert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mit einem NanoDrop-1000 (Pepqlab, Erlangen) bei 260 nm.

3.2.6 cDNA – Reverse Transkription

1 µg Gesamt-RNA wurden mit ddH₂O auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt und mit jeweils 2 µl *DNA wipe out buffer* (quiagen, Hilden) für 2 min bei 42 °C zur Elimination von Resten genomischer DNA inkubiert. Jede Probe wurde dann mit einem Mix aus 4 µl „*RT-Buffer*“, 1 µl „*Nucleotide Mix*“ und 1 µl Reverse Transkriptase (alle quiagen, Hilden) weitere 30 min bei 42 °C in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Für die *real-time* quantitative PCR wurde das Volumen des cDNA-Ansatzes mit 100 µl ddH₂O auf ein Endvolumen von 120 µl aufgefüllt.

3.2.7 realtime RT quantitative PCR (qPCR)

Zur Evaluation der transkriptionellen Genregulation wurden relative mRNA-Level mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) bestimmt. Die PCR wurde in einem ABI 7300 real time System (Applied Biosystems, Darmstadt) mit Platinum SYBR green qPCR SuperMix-UDG kit (invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Der Reaktionsmix für jedes zu quantifizierende Gen enthielt 10 µl Platinum SYBR green qPCR SuperMix-UDG, 5 µl cDNA und 2,5 µl jedes Primers (Endkonzentration: 10 pM) in einem Endvolumen von 20 µl. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als endogene Kontrolle gewählt und unter den gleichen Reaktionsbedingungen quantifiziert. Alle PCR-Primer-Sequenzen wurden mit der Primer3-Software entworfen (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Die PCR-Zyklen wurden wie folgt festgelegt: 50 °C für 2 min und 95 °C für 2 min, gefolgt von 40 repetitiven Zyklen bestehend aus Denaturierung: 95 °C für 30 Sekunden und „Annealing“ und „Amplifikation“: 60 °C für 30 Sekunden. Während der letzten Schritte wurde zwecks Analyse der Dissoziationskurven ein Temperaturgradient zwischen 60 °C und 95 °C festgelegt, um die PCR-Qualität zu überprüfen. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne *template*-DNA, mit Wasser anstelle von cDNA, und eine negative reverse Transkription. Die Expression des Gens von

Interesse wurde für jede Probe relativ zur internen Kontrolle Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode (Dai *et al.*, 2007) kalkuliert.

3.2.8 Proliferation

Die Proliferation wurde über den Einbau radioaktiv markierten [^3H]-Thymidins evaluiert. Hierzu wurden humane, glatte Gefäßmuskelzellen (VSMCs) in einer Dichte von 15.000 Zellen in 24-Loch Kulturplatten ausgesät und nach 24 Stunden durch Serumentzug synchronisiert. Weitere 24 Stunden später wurden die VSMC – wie unter 3.2.1 auf Seite 48 beschrieben – für 24 Stunden stimuliert. 18 Stunden nach Zugabe der Stimuli wurden in jeden Ansatz 1 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-Thymidin (Perkin Elmer, Bodgau-Jügesheim) gegeben und für die letzten 6 Stunden mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit jeweils 1 ml 1x PBS gewaschen. Die Inkorporation des [^3H]-Thymidins wurde mit hypochloriger Säure gestoppt. Hierzu wurden die Ansätze einmal mit 500 μl hypochloriger Säure gewaschen und anschließend für 2 Minuten mit 500 μl hypochloriger Säure inkubiert. Nach Absaugen der hypochlorigen Säure wurden je Ansatz 300 μl 0,1 M NaOH zugegeben und die 24-Loch Kulturplatten für 15 min leicht schwenkend bei 37 °C inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Von diesen Lysaten wurden 30 μl für spätere Proteinbestimmungen bei -20 °C gelagert. Das übrige Zellysat wurde in Szintillationsröhrchen gefüllt, mit 4,7 ml Szintillationsflüssigkeit (Lumac LSC, Niederlande) aufgefüllt und jede Probe wurde in einem beta-Counter (Beckmann Coulter, Krefeld) 3 min. vermessen. Die „counts per minute“ wurden anschließend auf die Proteinmenge normalisiert.

3.2.9 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mit der Methode nach Bradford. Hierzu wurde eine BSA-Eichreihe von 2 μg bis 12 μg BSA angesetzt. Anschließend wurde Bradford-Reagenz (Biorad, München) 1:5 mit ddH₂O verdünnt und in einem Volumen von 200 μl in die Eichreihen- und Proteinproben gegeben. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 595 nm in einem ELISA-Reader (Thermo Electron, Karlsruhe).

3.2.10 HA-Größenausschlußchromatographie

Zur Bestimmung der relativen Molekulargewichtsverteilung der HA wurden VSMC parallel zur Stimulation mit PDGF und E₂ für 24 Stunden mit 40 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-

Glukosamin (Perkin Elmer, Bodgau-Jügesheim) inkubiert. 24 Stunden nach der Markierung/Stimulation wurde der Mediumsüberstand für 12 Stunden bei 37 °C mit 500 µg/ml Pronase (SIGMA, Steinheim) verdaut. Die Pronase wurde durch 20-minütiges Erhitzen der Probe bei 100 °C inaktiviert und der Pronaseverdau so terminiert. Der gesamte Überstand wurde zwecks Abtrennung des nicht eingebauten [³H]-Glukosamins auf eine Sephadex G50-Säule mit einem Bettvolumen von 4 ml gegeben, die zuvor einige Male mit *swelling*-Puffer (0,1 M Tris, 0,1 M Na-Acetat, 0,02 % NaN₃, pH 7,3 mit 99 %-iger Essigsäure eingestellt) äquilibriert worden war. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurde mit 1,5 ml Elutionspuffer (0,1 M Tris, 0,1 M Acetat, 0,025 % CHAPS – (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat)) eluiert und die makromolekulare Fraktion gesammelt. 20 µl des Eluats wurden nach Zugabe von 4 ml Szintillationsflüssigkeit 3 min in einem beta-Counter (Beckmann Coulter, Krefeld) vermessen. Entsprechend der Messergebnisse wurden 20.000 *counts* des Eluats der mit [³H]-Glukosamin markierten Glykoasminoglykane im Überstand zunächst mit 20 µl VitaminB12 (SIGMA, Steinheim)-Lösung (10 mg in 1 ml dH₂O, Überstand nehmen) versetzt und dann auf einer Sephacryl S-1000 Säule entsprechend der Größe chromatographisch separiert. Hierzu wurden die Proben auf die Säule gegeben und nach Einlaufen in die Säule mit 3 cm Laufpuffer (0,5 M Acetat, 0,02 % NaN₃, 0,025 % CHAPS, pH 7,0) überdeckt. Alle 2 ½ Minuten wurde das durch die Säule laufende Volumen in jeweils einzelnen Fraktionen in Szintillationsröhrchen aufgefangen, bis der letzte VitaminB12-Marker aus der Säule herausgelaufen war. Anschließend wurde jedes Szintillationsröhrchen mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit aufgefüllt und alle Proben wurden für 3 min vermessen.

3.2.11 Lentiviren

3.2.11.1 Plasmid-Vektor-Konstruktion

Lentivirale Vektoren können große cDNAs in eine Reihe sich teilender und nicht teilender Zellen einbringen, einschließlich terminal differenzierter Säugetierzellen wie z.B. Lymphozyten oder Makrophagen. Wegen der fehlenden Toxizität und Immunantwort sind Lentiviren ein attraktives Instrument für den Transfer von Genen. Die Sicherheit von lentiviralen Vektoren ist mit der Generierung von selbst-inaktivierenden und mit nur einem minimalen Verpackungssystem ausgestatteten Viren verbessert worden. Das HIV-Hüllprotein wurde zunächst durch ein VSV-G

ersetzt. Um die Menge der HIV-kodierenden Regionen im Verpackungssystem weiter zu minimieren, wurde eine zweite Virusgeneration mit extensiven Deletionen des viralen Genoms entwickelt. Dieses Verpackungssystem der 2. Generation enthält nur die *gag*, *pol*, *tat* und *rev* Gene des HIV-1 und ihm fehlen alle akzessorischen Gene, weil diese (*vpr*, *vpu*, *vif* und *nef*) für eine effiziente Produktion von Viruspartikeln nicht notwendig sind. Diese zweite Generation des lentiviralen Verpackungssystems enthält drei Plasmide. Das pVSVG ist das Plasmid, das für das Hüllprotein kodiert. pCD/NL-BH ist das Verpackungsplasmid. pCI1 (Appendix 2, Seite 160) wurde als Transferplasmid gewählt und zugleich als Leervektor verwendet, der durch seine EGFP-Expression charakterisiert ist. Die „multiple cloning site“ (mcs) im pCI1 wurde mit XhoI und EcoRI restriktionsverdaut. Die „full length“-cDNA der humanen HAS1 und HAS2 wurde durch RT-PCR aus Gesamt-RNA humaner glatter Gefäßmuskelzellen generiert (verwendete Primerpaare: s. Appendix 3, Seite 161) und schließlich in die mcs des pCI1-Vektors kloniert. Die Vektoren wurden im Anschluss an die Klonierung sequenziert und die korrekte Insertion der cDNA so verifiziert.

3.2.11.2 Virenproduktion

Am Tag vor der Transfektion wurden HEK293T Zellen in einer Dichte von $2,5 - 3 \times 10^6$ Zellen in d100-Zellkulturschalen ausgesät. Für die Virenproduktion wurde DMEM-Medium – supplementiert mit 10 % (v/v) hitze-inaktiviertem FCS (PAN biotech, Aidenbach) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung (invitrogen, Karlsruhe) – verwendet. Die Transfektion wurde mittels der Polyethylenimin (PEI) (Sigma-Aldrich, München) Methode durchgeführt. 5 µg Transfervektor – entweder pCI1 oder HAS1- bzw. HAS2-Überexpressionsvektoren (pCI1mcs-HAS1/HAS2) –, 5 µg des Verpackungsplasids (pCD/NL BH) und 5 µg des Hüllplasids (pVSVG) wurden in DMEM(0)-Medium auf ein Endvolumen von 2 ml verdünnt. 45 µl einer PEI-Lösung (1 mg/ml) wurden zu dem Vektormix gegeben, vorsichtig vermischt und anschließend 20 Minuten bei 22 °C unter sterilen Zellkulturbedingungen inkubiert, damit sich der DNA-PEI-Komplex formen konnte. Das 293T-Kulturmedium wurde durch 4 ml DMEM – supplementiert mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung – ersetzt. Der DNA-PEI-Komplex wurde gleichmäßig und tröpfchenweise zu den 293T-Zellen gegeben. Nach vorsichtigem Schwenken wurden die 293T-Zellen 16 Stunden unter feuchten Bedingungen bei 37 °C und 5 %

CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium durch Komplett-Medium, das 10 mM Natriumbutyrat (Sigma, Steinheim) enthielt, ersetzt, um die CMV (Cytomegalievirus)-Promotor-Aktivität zu induzieren. Sechs Stunden nach der Induktion wurde das Kulturmedium durch 5 ml IMDM-Medium (Sigma-Aldrich, München) ersetzt, das mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung supplementiert war. Das virenenthaltende IMDM-Medium wurde 24 Stunden nach der Induktion geerntet und durch einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert. Abschließend wurde das virenenthaltende Medium aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.11.3 Infektion von VSMC

Humane, glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) wurden bei Erreichen von ca. 60 % Konfluenz infiziert. Für die Transduktion wurde DMEM-Medium verwendet, das mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung supplementiert war. Für die Infektion wurden gleiche Virustiter auf Eis in Medium mit 10 µg/ml Protaminsulfat (Sigma-Aldrich, München) verdünnt und tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Protaminsulfat ist ein kleines positiv geladenes Molekül, das an Zelloberflächen bindet, deren Ladung neutralisiert und dadurch die Transduktionseffizienz durch Lentiviren stark erhöht. Das Zellkulturmedium wurde nach 24 Stunden erneuert. Nach 96 Stunden wurden die Stimulationsversuche mit Synchronisierung der Zellen durch Serumentzug – wie unter 3.2.1 auf Seite 48 – beschrieben, initiiert.

3.3 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt. Unterschiede zwischen den Gruppen „Plazebo“ und „E₂“ sowie „Kontrolle“ und „OVX“ wurden mittels t-Test analysiert. Zur Evaluation von Signifikanzen zwischen den Gruppen „Plazebo“, „MPA“ und „MPA + E₂“ hinsichtlich der Plaquescores, der quantitativen Bildanalysen, der Resultate aus den Thrombosemessungen, der EC₅₀-Konzentrationen von ACh und SNAP, der CD62P-Expression, der ETPs sowie für die Zellversuche wurde jeweils eine *one-way ANOVA* durchgeführt. Die Analyse der statistischen Signifikanz zwischen den Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurde mittels *two-way ANOVA* durchgeführt. p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant erachtet. Die Signifikanzanalysen wurden mit der Prism GraphPad 4.0 Software durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Tierversuche

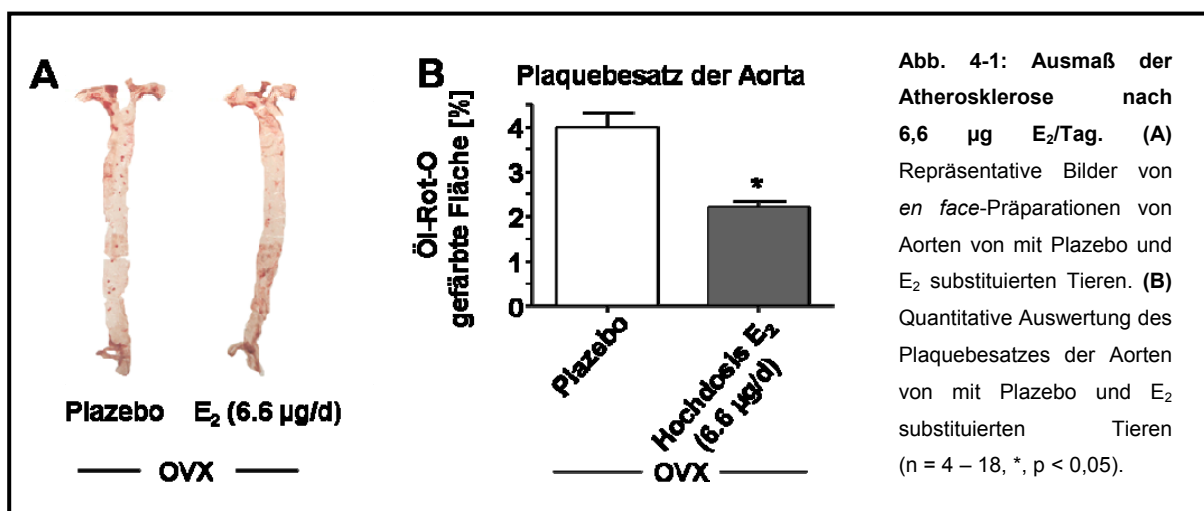
4.1.1 Effekte von endogenen ovariellen Steroiden und exogen substituiertem Estradiol auf die Atherosklerose im Tiermodell

Vor dem Hintergrund der einleitend beschriebenen klinischen Studien, die einen protektiven Effekt einer kombinierten Hormonersatztherapie ebenso wenig wie den einer Estrogen-Monotherapie bestätigen konnten, war es Ziel dieser Arbeit, ein Mausmodell zu etablieren, mit dem nachteilige Effekte von E_2 auf den Symptomenkomplex der Atherothrombose, erstmals auch im Tiermodell dargestellt und in Zukunft für mechanistische Studien verwendet werden können.

Zunächst wurde der Effekt einer Depletion endogen zirkulierender Steroide durch Ovariectomie sowie einer Substitution mit E_2 in Hinblick auf deren atherogene Wirkung untersucht.

4.1.1.1 Atherosklerose nach Substitution von 6,6 $\mu\text{g } E_2/\text{Tag}$

Zur Validierung des Modells wurde eine Substitution mit supraphysiologischen E_2 -Dosierungen (6,6 $\mu\text{g}/\text{Tag}$) vorgenommen, um sicherzustellen, dass bereits beschriebene anti-atherogene Wirkungen von E_2 im Tierversuch am Modell der ApoE^{-/-}-Maus reproduziert werden konnten. Nach Substitution von ApoE^{-/-}-Mäusen mit 6,6 $\mu\text{g}/\text{Tag } E_2$ für einen Zeitraum von 90 Tagen zeigte sich eine signifikante Reduktion des Ausmaßes der Atherosklerose [Placebo: 4 % \pm 0,3 % vs. E_2 (6,6 $\mu\text{g}/\text{Tag}$): 2,4 % \pm 0,2 %, n = 4 – 18, p < 0,05].

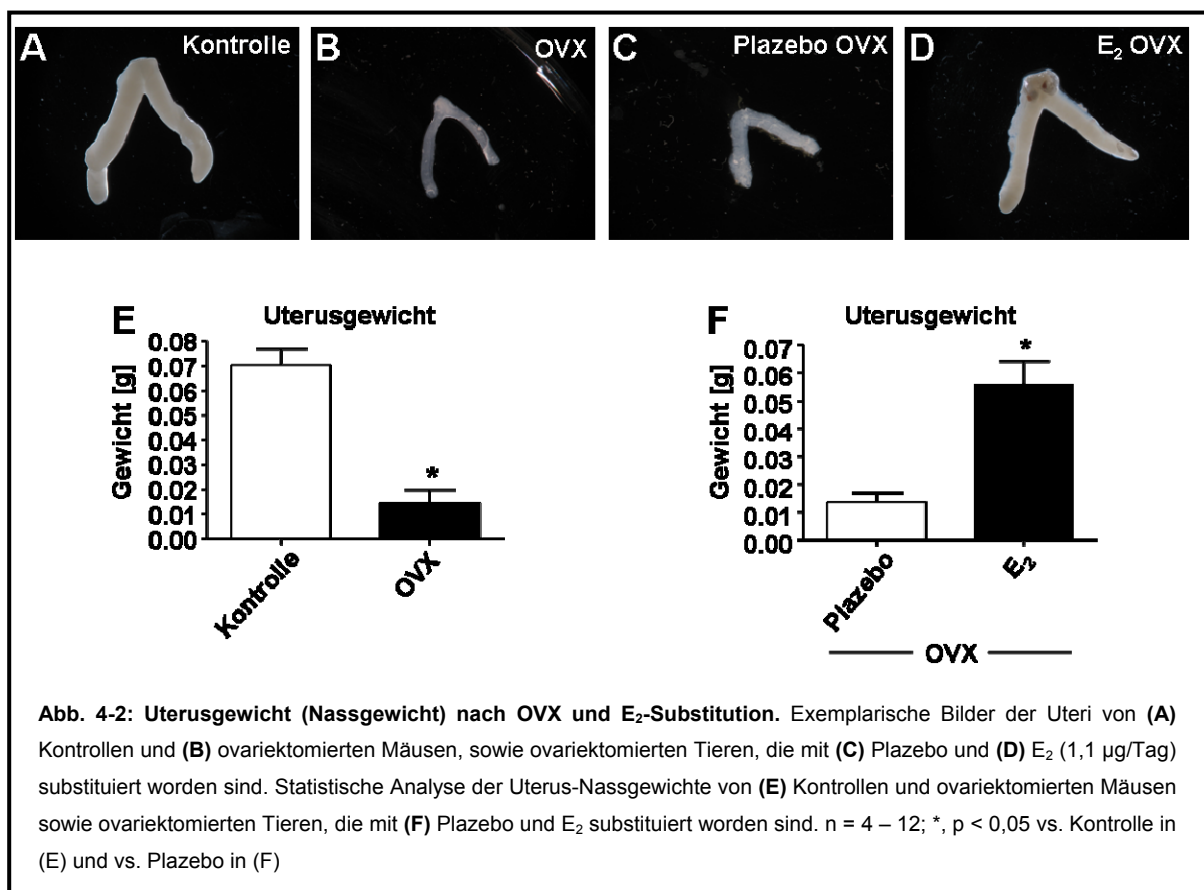


Das eigentliche Interesse lag in der Folge jedoch in der Beantwortung der Frage nach den atherogenen Effekten einer Estrogen-Ersatztherapie mit niedrigeren als den in den bisherigen Tierexperimenten verwendeten E_2 -Dosierungen. Mit $1,1 \mu\text{g}$ E_2 /Tag wurde daher eine Substitutionsdosis gewählt, die den vorsichtigen Einsatz von niedrig dosiertem E_2 bei Frauen, die mit einer Hormonersatztherapie behandelt werden, widerspiegelt und eher an die in der Humantherapie geltenden Therapieschemata angelehnt ist. Für eine postmenopausale Hormonersatztherapie ist in keinem Fall die Substitution supraphysiologischer Dosen vorgesehen.

4.1.1.2 Substitution von $1,1 \mu\text{g}$ E_2 /Tag

4.1.1.2.1 Bestimmung der Uterusgewichte und Estradiol-Plasmaspiegel

Um zunächst zu evaluieren, ob die für die Substitution gewählte E_2 -Dosis von $1,1 \mu\text{g}$ /Tag tatsächlich Effekte im physiologischen und nicht im supraphysiologischen Bereich hatte, wurden als physiologischer Parameter zur Validierung der Ovariectomie und der nachfolgenden Hormonsubstitution die Uterusgewichte der Tiere aus den verschiedenen Versuchsgruppen am Ende der Versuchsperiode im Alter von 132 Tagen bestimmt.



Im Vergleich zum Uterusgewicht nicht ovariectomierter Kontrolltiere war das Uterusgewicht ovariectomierter Mäuse signifikant reduziert (Kontrolle: $0,070 \text{ g} \pm 0,007 \text{ g}$ vs. OVX: $0,015 \text{ g} \pm 0,005 \text{ g}$, $n = 4 - 12$, $p < 0,05$). Die durch OVX induzierte Uterusatrophie wurde im Vergleich zu plazebosubstituierten Tieren durch E_2 aufgehoben (Plazebo: $0,014 \text{ g} \pm 0,004 \text{ g}$ vs. E_2 : $0,056 \text{ g} \pm 0,008 \text{ g}$, $n = 4 - 5$, $p < 0,05$).

Als direkter Parameter zum Nachweis der durch OVX induzierten Depletion eines großen Teils des endogen zirkulierenden Estradiols sowie der Erhöhung zirkulierender E_2 -Spiegel nach exogener Estradiol-Substitution wurden die E_2 -Plasma-Spiegel in – mit NaCl/EDTA antikoaguliertem – Plasma bestimmt. Es wurden sowohl der „ultrasensitive radioactive immunoassay (RIA) DSL-4800“ von Beckman Coulter GmbH (Sinsheim, Germany) als auch der „enzyme immunoassay (EIA)“ von American Research Products, Inc.TM verwendet. In beiden Fällen lag die Extinktion aufgrund des hoch lipämischen Plasmas und einem dadurch bedingten ausgeprägten Löschen des Estradiolsignals häufig nur im Bereich der Extinktion des Puffers oder sogar darunter, so dass die E_2 -Plasma-Konzentrationen nicht bestimmt werden konnten.

4.1.1.2.2 Bestimmung der Körpergewichte und des Lipidprofils

Zur Beantwortung der Frage, ob die Ovariectomie bzw. die Hormonsubstitution mit E_2 Effekte auf das Körpergewicht der Mäuse oder deren Lipidprofil haben, wurden die Tiere am Ende der experimentellen Periode gewogen und es wurden die Gesamtcholesterol- und Triglyzeridspiegel im Plasma bestimmt.

Wie in Tabelle 4-1 auf Seite 60 dargestellt, war das Körpergewicht nach Ovariectomie signifikant erhöht (Kontrolle: $26,4 \text{ g} \pm 0,4 \text{ g}$ vs. OVX: $35,9 \text{ g} \pm 0,6 \text{ g}$, $n = 16 - 20$, $p < 0,05$) und im Vergleich zum Gewicht plazebosubstituierter Tiere nach Behandlung mit E_2 wieder auf das Niveau von Kontrolltieren reduziert (Plazebo: $35,0 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$ vs. E_2 : $27,9 \text{ g} \pm 0,9 \text{ g}$, $n = 14 - 20$, $p < 0,05$). Hinsichtlich der Plasmaspiegel für Gesamtcholesterol und Triglyzeride zeigte sich in keiner der Gruppen ein Unterschied.

Tab. 4-1: Zusammenfassung der Körpergewichte und des Lipidprofils nach OVX und E₂-Substitution. Körpergewichte, Gesamtcholesterol- und Triglyzeridspiegel von (A) Kontrollen und ovariectomierten Mäusen und ovariectomierten Mäusen, die mit (B) Plazebo und E₂ substituiert worden sind. n = 8 – 20, *, p < 0,05 vs. Kontrolle in (A) und vs. Plazebo in (B)

A		Kontrolle	OVX
	Körpergewicht [g]	26.4 ± 0.4	35.9 ± 0.6 *
	Gesamtcholesterol [mg/dl]	864.6 ± 53.1	987.0 ± 50.0
	Triglyzeride [mg/dl]	102.9 ± 15.3	126.3 ± 13.7

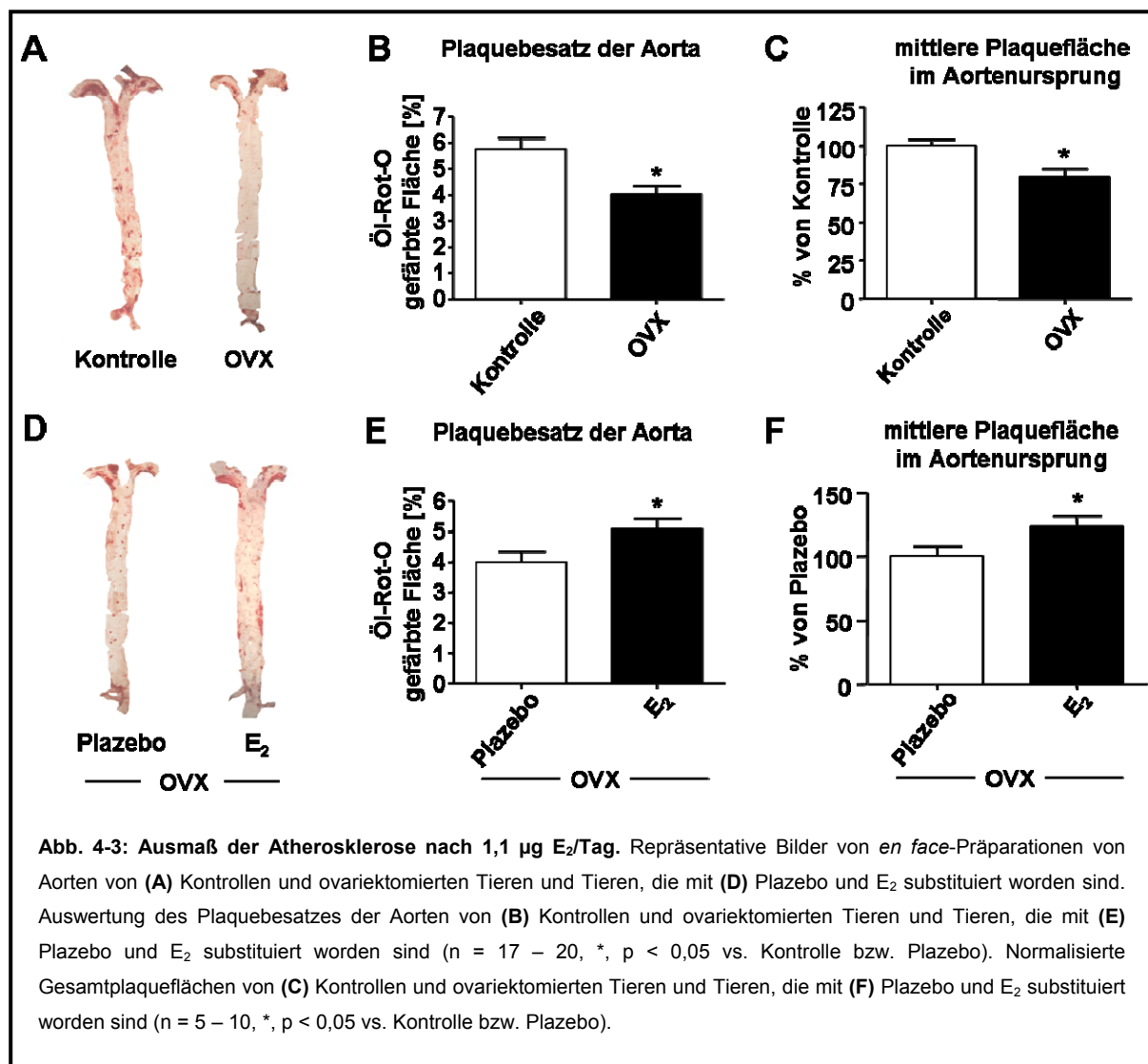
B		Plazebo OVX	E₂ OVX
	Körpergewicht [g]	35.0 ± 0.5	27.9 ± 0.9 *
	Gesamtcholesterol [mg/dl]	806.8 ± 80.5	775.1 ± 47.6
	Triglyzeride [mg/dl]	85.3 ± 14.1	97.3 ± 14.6

4.1.1.2.3 Atherosklerose

Als Maß für das atherogene Potential endogenen sowie in physiologischen Dosierungen substituierten Estradiols wurde der Plaquebesatz der Aorta in Gesamtaortenpräparationen, die mit Öl-Rot-O gefärbt worden waren, quantifiziert und als der prozentuale Anteil der rot gefärbten Fläche an der Gesamtaortenfläche bestimmt.

Ovariectomierte Tiere zeigten im Vergleich zu nicht ovariectomierten Kontrolltieren einen signifikant erniedrigten Plaquebesatz in den Aorten, der durch exogene Substitution von E₂ im Vergleich zum Plaquebesatz plazebobehandelter Tiere wieder aufgehoben wurde (Kontrolle: 5,7 % ± 0,4 % vs. OVX: 4,0 % ± 0,3 %, n = 17 – 20, p < 0,05; Plazebo: 4,0 % ± 0,3 % vs. E₂: 5,1 % ± 0,3 %, n = 17 – 20, p < 0,05). Die verstärkte Atherosklerose konnte auch im Aortenursprung verifiziert werden. Hier war die Gesamt-Plaquesfläche von Kontrolltieren mit intakter, ovarieller Steroidsynthese sowie von den Tieren, die nach Ovariectomie mit E₂ substituiert worden sind, signifikant höher als die Plaquesfläche in ovariectomierten bzw. plazebobehandelten Tieren. Die Gesamtplaquesfläche wurde als Quadratpixel vermessen und anschließend auf die jeweilige Kontrollgruppe (Kontrolle bzw. Plazebo) normalisiert

(Kontrolle: $100 \% \pm 4,2 \%$ vs. OVX: $79,5 \% \pm 5,6 \%$, $n = 17 - 20$, $p < 0,05$; Plazebo: $100 \% \pm 8,0 \%$ vs. E_2 : $123,6 \% \pm 8,4 \%$, $n = 17 - 20$, $p < 0,05$).

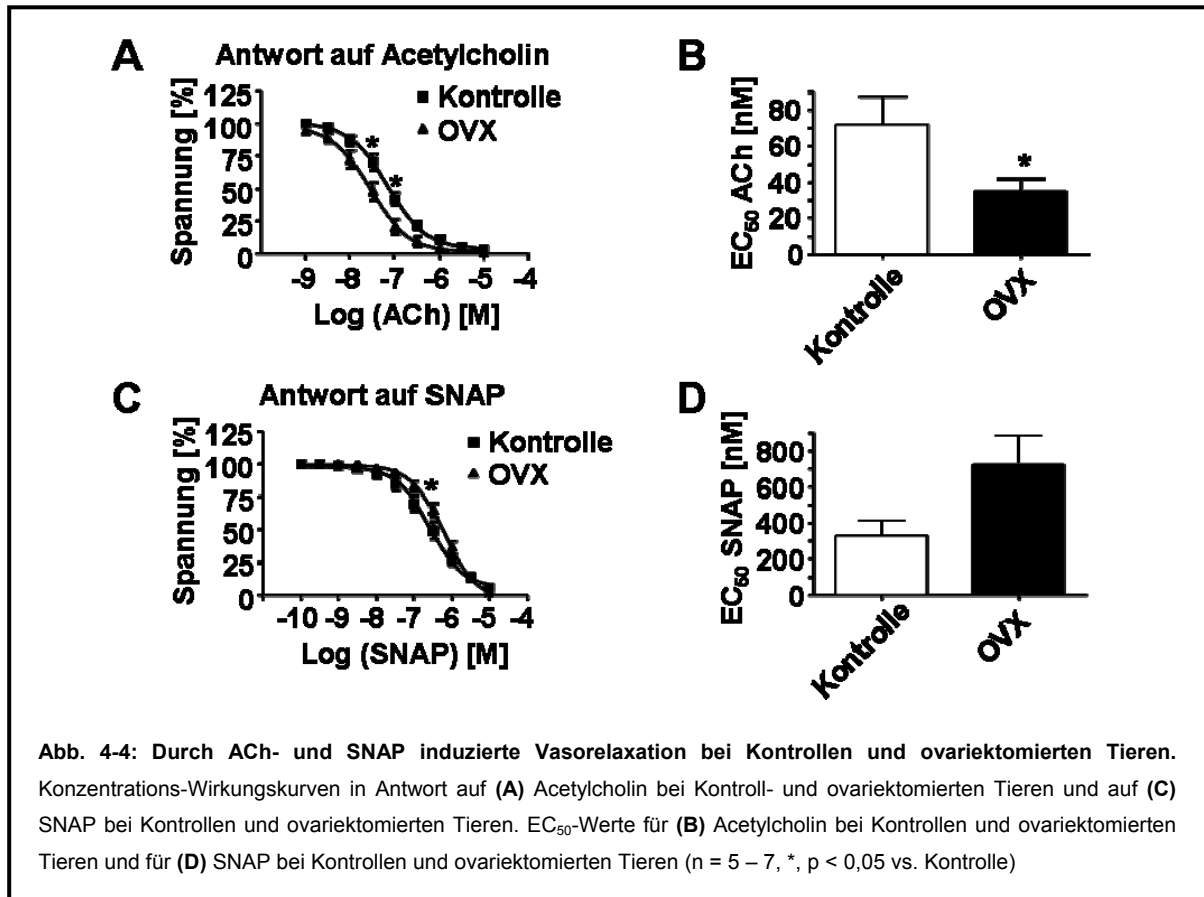


Endogene, ovarielle Steroide und – in physiologischen Dosierungen exogen subkutan substituiertes – E₂ erhöhten das Ausmaß der Atherosklerose sowohl in Gesamtaortenpräparationen als auch im Aortenursprung somit um mehr als 20 %.

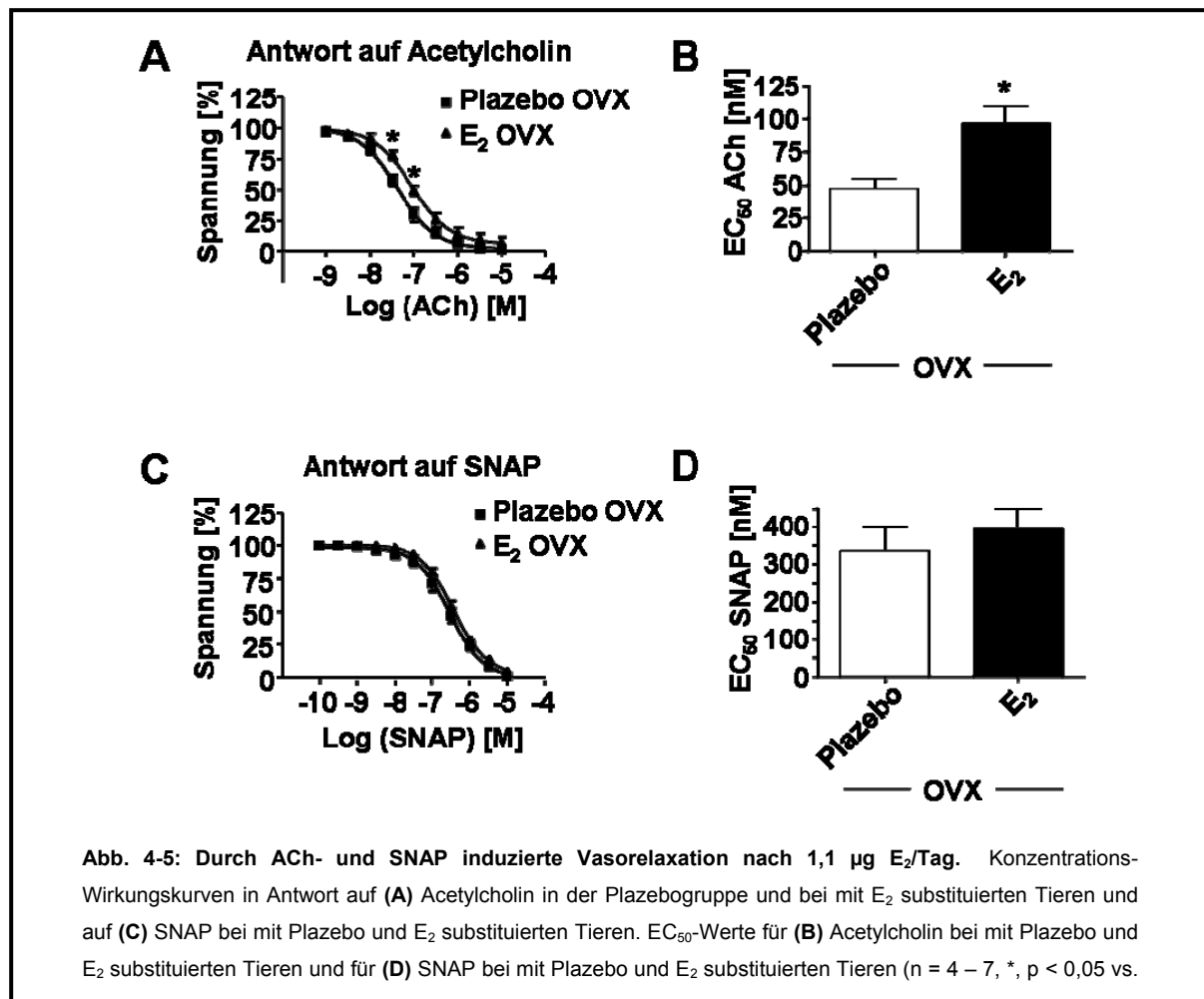
4.1.1.2.4 Endothelfunktion

Als zugrunde liegender Mechanismus einer verstärkten Atherosklerose ist eine beeinträchtigte Endothelfunktion denkbar, weil eine endotheliale Dysfunktion der Manifestation atherosklerotischer Ablagerungen vorausgehen kann. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Untersuchungen zur Endothelfunktion angeschlossen und

zunächst die acetylcholininduzierte endothelabhängige Vasorelaxation nach halbmaximaler Vorkontraktion mit Phenylephrin analysiert.



Es zeigte sich sowohl in den Konzentrations-Wirkungs-Kurven als auch in den EC₅₀-Werten für ACh, dass ovariectomierte Tiere eine bessere Endothelfunktion besaßen als Kontrolltiere (Kontrolle: 71,6 nM ± 16,0 nM vs. OVX: 34,6 nM ± 7,2 nM, n = 5 – 7, p < 0,05). Die Endothelspezifität dieses Effektes wurde durch Analyse der endothelunabhängigen Vasorelaxation in Antwort auf den exogenen NO-Donor SNAP validiert. In diesen Versuchen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede für die EC₅₀-Werte (Kontrolle: 326,7 nM ± 85,6 nM vs. OVX: 722,1 nM ± 166,2 nM, n = 6 – 7). Bei einer Konzentration von 300 nM SNAP zeigten Aortenringe ovariectomierter Tiere in den Konzentrations-Wirkungs-Kurven sogar eine signifikant verschlechterte Antwort auf SNAP.



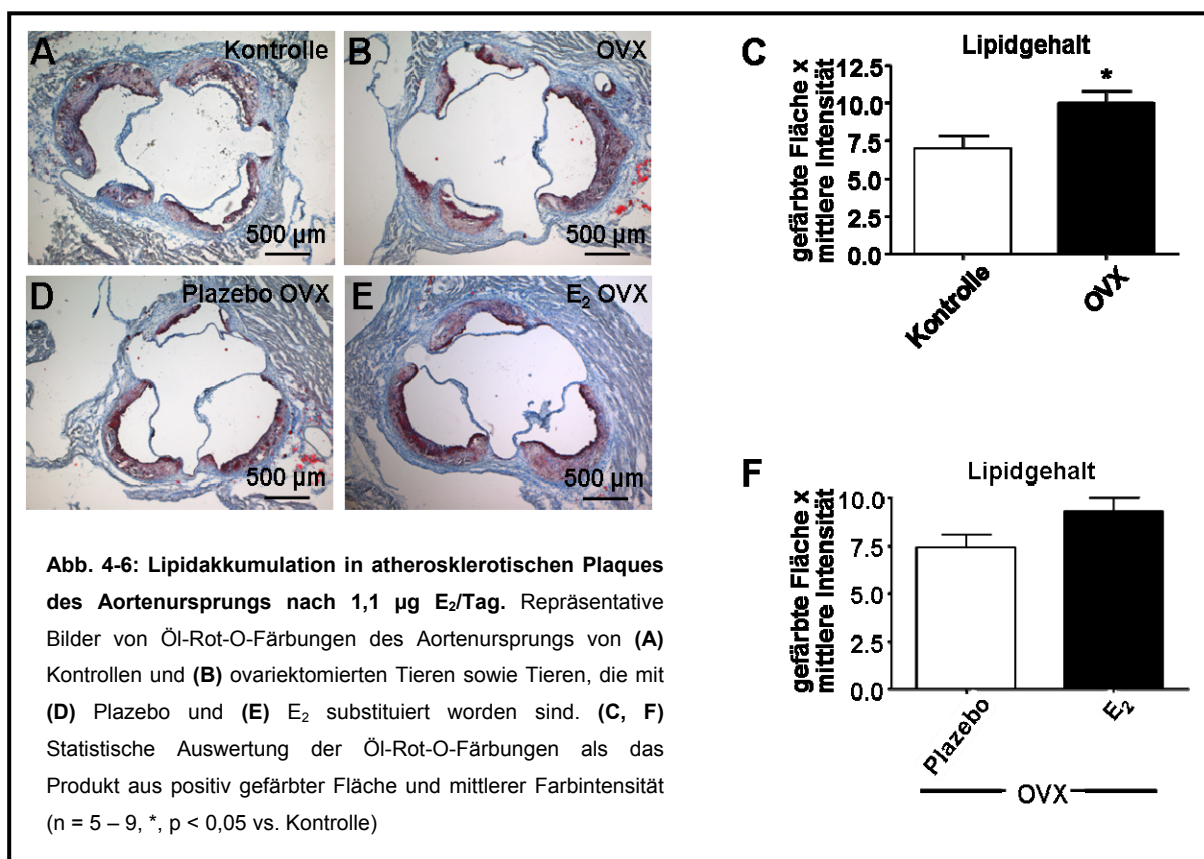
Die Relaxation in Antwort auf Acetylcholin war bei mit E₂ substituierten Tieren, im Vergleich zu der Relaxation bei mit Plazebo behandelten Tieren, verschlechtert, so dass ein Zusammenhang zwischen der durch E₂ verstärkten Atherosklerose und der gleichermaßen verschlechterten Endothelfunktion zu bestehen scheint (Plazebo: 47,5 nM ± 7,7 nM vs. E₂: 96,3 nM ± 12,6 nM, n = 4 – 6, p < 0,05).

Die Endothelspezifität des Effektes konnte auch in diesen beiden Gruppen bestätigt werden, da sich keine Unterschiede hinsichtlich der Ansprechbarkeit auf den exogenen NO-Donor SNAP zeigten (OVX: 334,5 nM ± 68,6 nM vs. E₂: 394,3 nM ± 54,9 nM, n = 6 – 7). Um zu evaluieren, ob dem pro-atherogenen Phänotyp in mit E₂ substituierten Tieren zusätzlich ein zelluläres und/oder strukturelles Remodelling der Plaques zugrunde liegt, wurde die Plaquemorphologie in Hinblick auf Lipidakkumulation, Kollagengehalt und -fibrillendichte, Hyaluronsäureakkumulation, Makrophagen-Retention, sowie α-SM-Aktin-Gehalt analysiert.

4.1.1.2.5 Plaquemorphologie

4.1.1.2.5.1 Lipidgehalt atherosklerotischer Plaques des Aortenursprungs

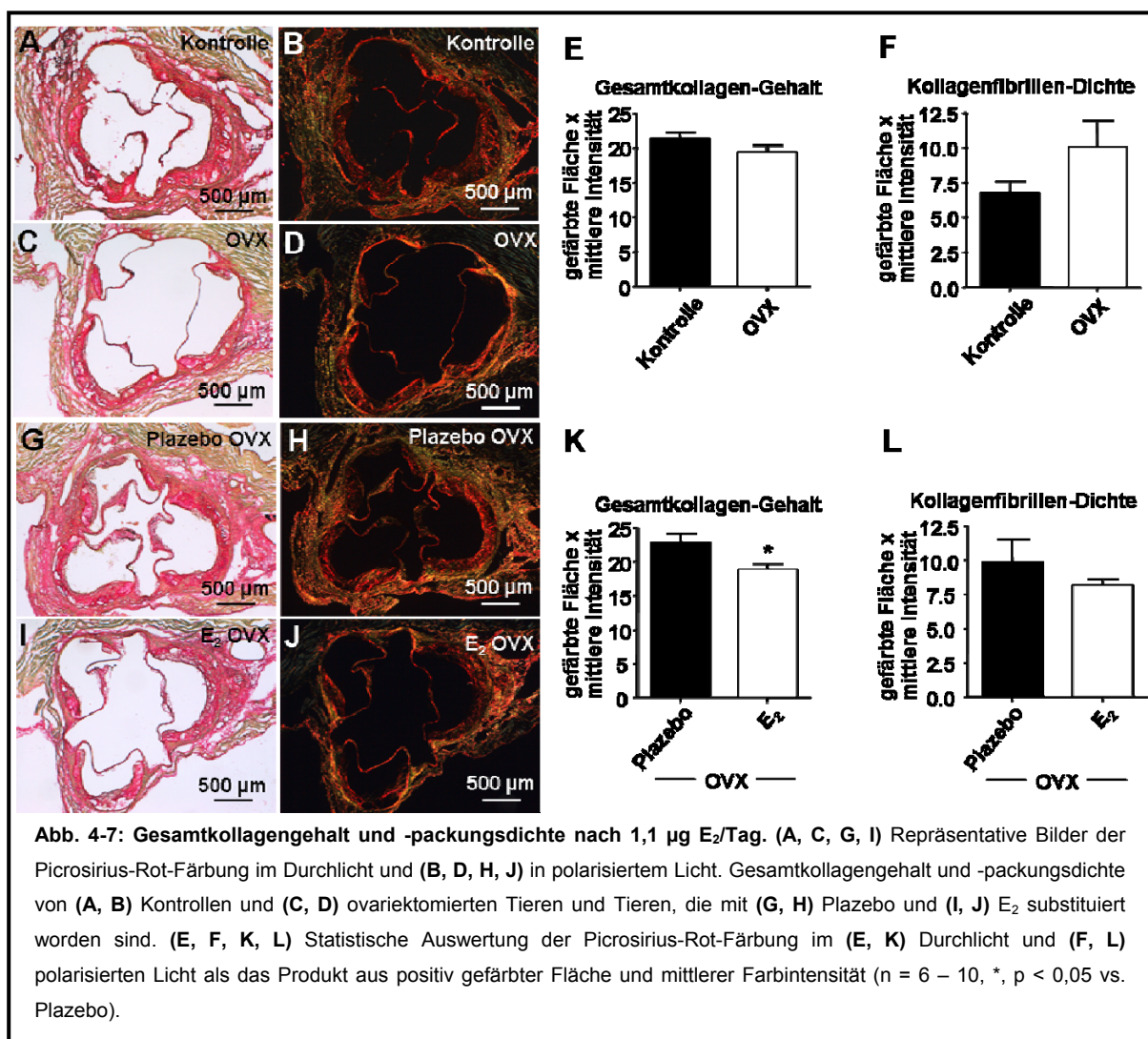
Das *Remodelling* atherosklerotischer Plaques – sowohl auf zellulärer als auch auf struktureller Ebene – ist ein weiterer wichtiger Parameter, der in Stabilisierung oder Destabilisierung von Plaques involviert sein kann. Zur Evaluation eventueller Unterschiede im Lipidgehalt atherosklerotischer Plaques wurden Präparate des Aortenursprungs mit Öl-Rot-O gefärbt und der Lipidgehalt wurde anschließend quantitativ als das Produkt aus gefärbter Fläche und mittlerer Farbintensität ausgewertet.



Es konnte gezeigt werden, dass eine Depletion ovarieller Steroide den Lipidgehalt atherosklerotischer Plaques des Aortenursprungs ovariectomierter Tiere im Vergleich mit dem Lipidgehalt nicht ovariectomierter Kontrolltiere signifikant erhöhte (Kontrolle: $7,0 \pm 0,8$ vs. OVX: $10,0 \pm 0,8$, n = 7 – 8, *, p < 0,05 vs. Kontrolle). Keine Unterschiede hinsichtlich des Lipidgehaltes in den Plaques des Aortenursprungs zeigten sich in der Gruppe der mit Placebo oder mit E₂ behandelten Tiere.

4.1.1.2.5.2 Kollagengehalt und -packungsdichte, Makrophagen-Retention und Hyaluronsäure-Akkumulation

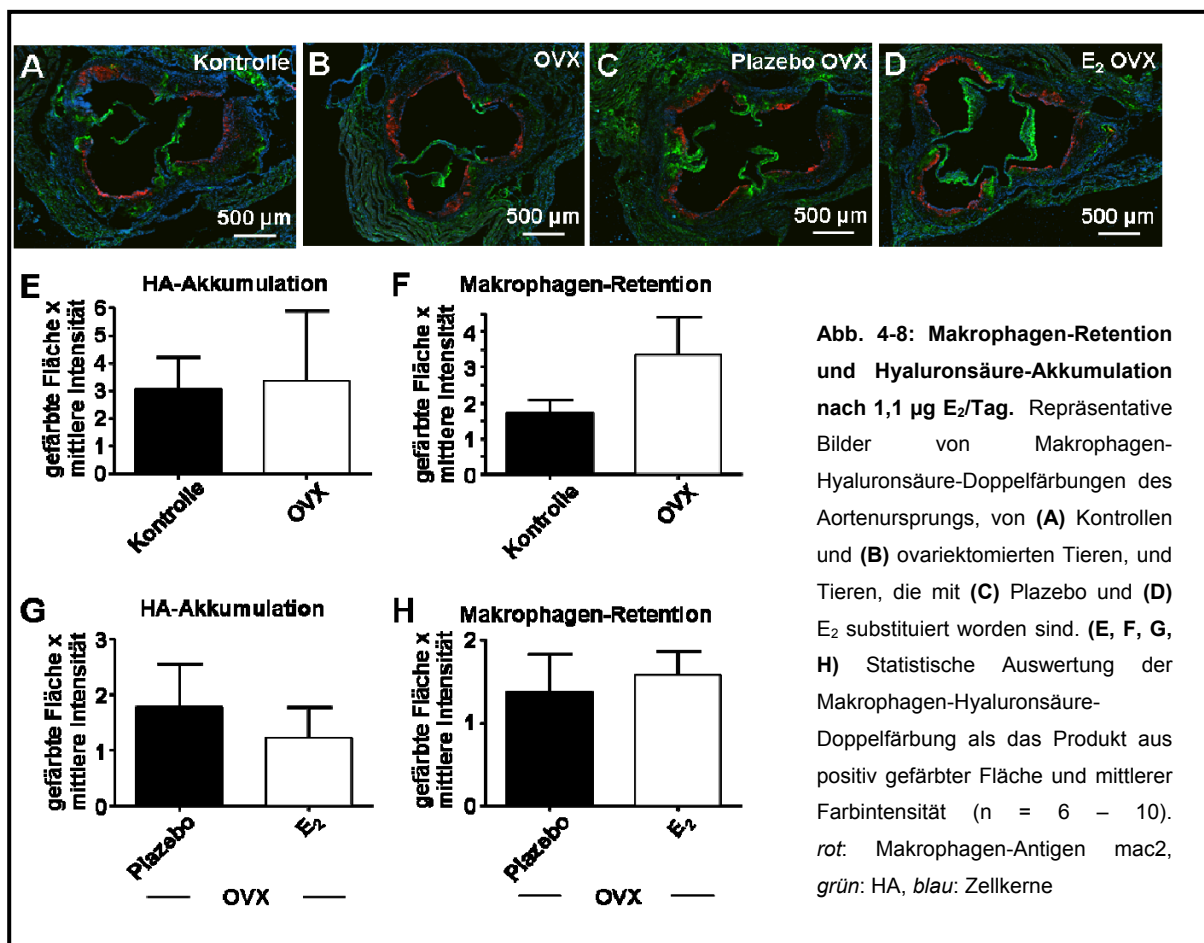
Um zu evaluieren, ob das erhöhte Ausmaß der Atherosklerose neben der eingeschränkten, vaskulären Reaktivität auch mit strukturellem *Remodelling* der extrazellulären Matrix in den atherosklerotischen Ablagerungen einhergeht oder auf inflammatorische Ereignisse zurückzuführen ist, wurden histologische Präparate des Aortenursprungs für Kollagen gefärbt.



Kollagen ist neben Hyaluronsäure eine wichtige Komponente der EZM, die atherosklerotischen Plaques strukturelle Integrität verleiht. Je nach Dichte, in der die Kollagenfibrillen „gepackt“ sind, kann dies auf eine stabilere oder eine labilere Plaquearchitektur hindeuten. Der Gesamt-Kollagengehalt in Präparaten des

Aortenursprungs aus den verschiedenen Gruppen wurde mit Picro-Sirius-Rot gefärbt und anschließend als das Produkt aus positiv gefärbter Fläche und mittlerer Pixelintensität ausgewertet. Die Packungsdichte kann unter polarisiertem Licht evaluiert werden, wobei dicht-gepacktes Kollagen dunkel-orange-rot und lockeres, neu synthetisiertes Kollagen grün erscheint. Es zeigte sich, dass nur in der Gruppe der mit E_2 substituierten Tiere im Vergleich zu der Gruppe der mit Plazebo behandelten Tiere der Gesamt-Kollagengehalt reduziert war, nicht aber in der Gruppe der Kontrolltiere im Vergleich zu der Gruppe ovariectomierter Tiere. Bezüglich der Packungsdichte der Kollagenfibrillen zeigte sich in Tieren mit intakter, ovarieller Steroidsynthese und in den Tieren nach exogener E_2 -Substitution ein tendenziell reduzierter Gehalt dicht gepackten Kollagens.

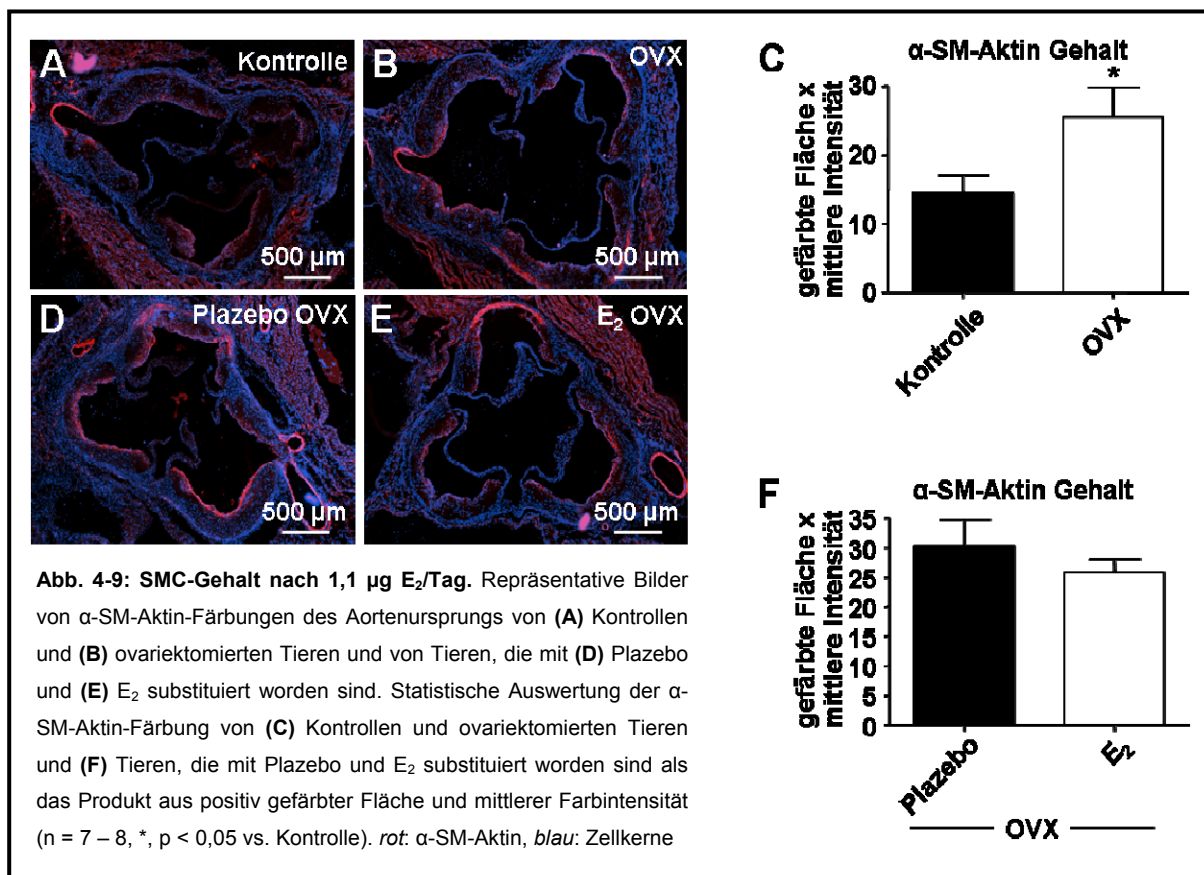
Der Gehalt an Hyaluronsäure (HA) und die Retention von Makrophagen wurden in einer Doppelfärbung für das Makrophagen-Antigen mac2 und die Matrix-Komponente HA analysiert.



Wie in Abbildung 4-8 auf Seite 66 dargestellt, zeigten sich in keiner der Gruppen Unterschiede hinsichtlich der Retention von Makrophagen oder des Gehalts an Hyaluronsäure in den Plaques.

4.1.1.2.5.3 Gehalt α -SM-Aktin positiver Zellen

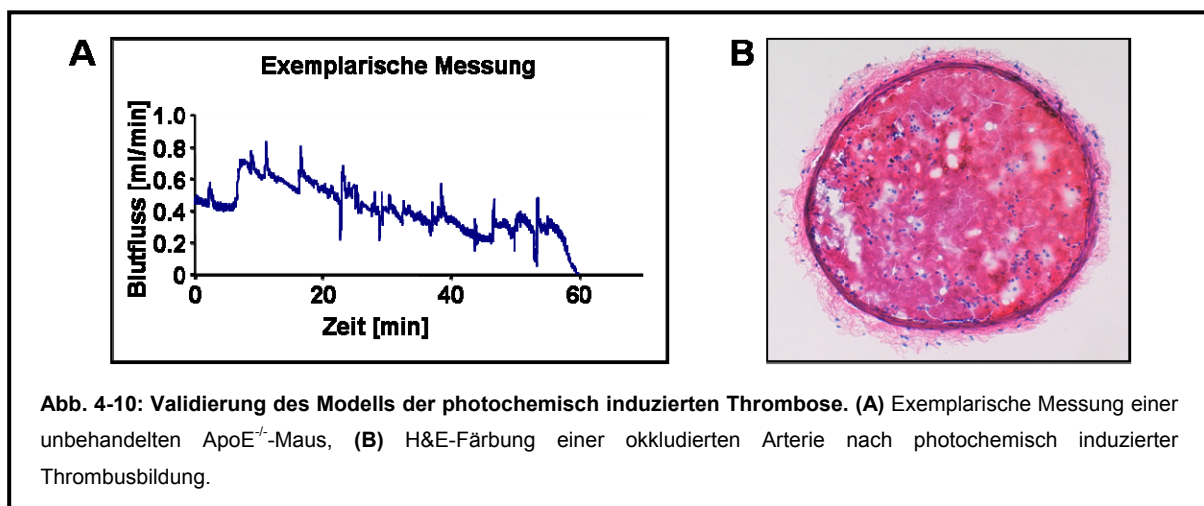
Wie einleitend bereits beschrieben, spielt die Präsenz glatter, α -SM-Aktin positiver Zellen eine wichtige Rolle in Hinblick auf die Stabilisierung der fibrotischen Kappe eines Plaques. Sie kann darüber hinaus zu einem luminal gerichteten Anwachsen des Plaques führen und so zur Verengung von Gefäßen beitragen. Um den Gehalt α -SM-Aktin positiver Zellen in der fibrotischen Kappe atherosklerotischer Plaques zu bestimmen, wurden Präparate des Aortenursprungs für glattmuskuläres α -Aktin gefärbt. Es zeigte sich erstaunlicherweise, dass die Depletion ovarieller Steroide durch Ovariectomie zu einer massiven Erhöhung α -SM-Aktin positiver Zellen in der fibrotischen Kappe der Plaques führte (Kontrolle: $14,5 \pm 2,5$ vs. OVX: $25,5 \pm 4,4$; $n = 7 - 8$, *, $p < 0,05$ vs. Kontrolle). Dieser Phänotyp ließ sich im Vergleich von mit Plazebo und E_2 substituierten Tieren durch E_2 partiell wieder aufheben.



Das durch Ovariectomie bzw. exogen substituiertes E₂ induzierte zelluläre (α -SM-Aktin positive Zellen) und strukturelle Remodelling (Kollagen) der Plaques könnte mit Effekten auf die Thrombusbildung assoziiert sein.

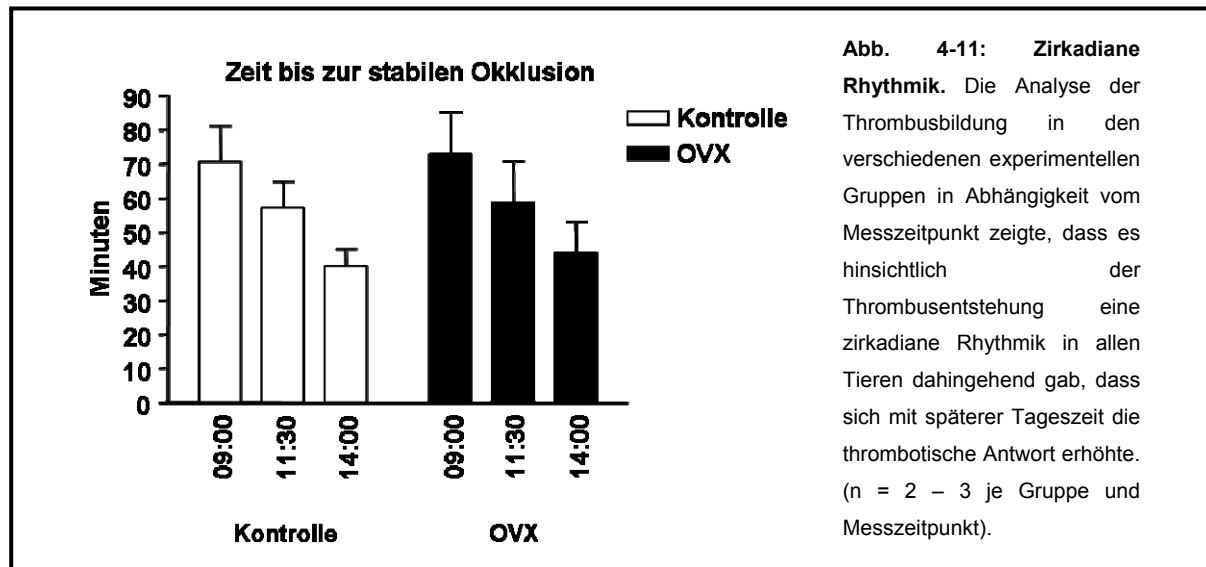
4.1.1.2.6 Evaluation der Thrombusbildung

Das thrombotische Potential, das mit einer Ovariectomie und der nachfolgenden Hormonsubstitution mit E₂ verbunden ist, wurde im Modell der laserbasierten photochemisch induzierten Thrombose evaluiert. Zu Beginn der Versuche wurde das Modell hinsichtlich seiner Kapazität, die Entstehung eines Thrombus in der *arteria carotis communis* von Mäusen zu induzieren, validiert.

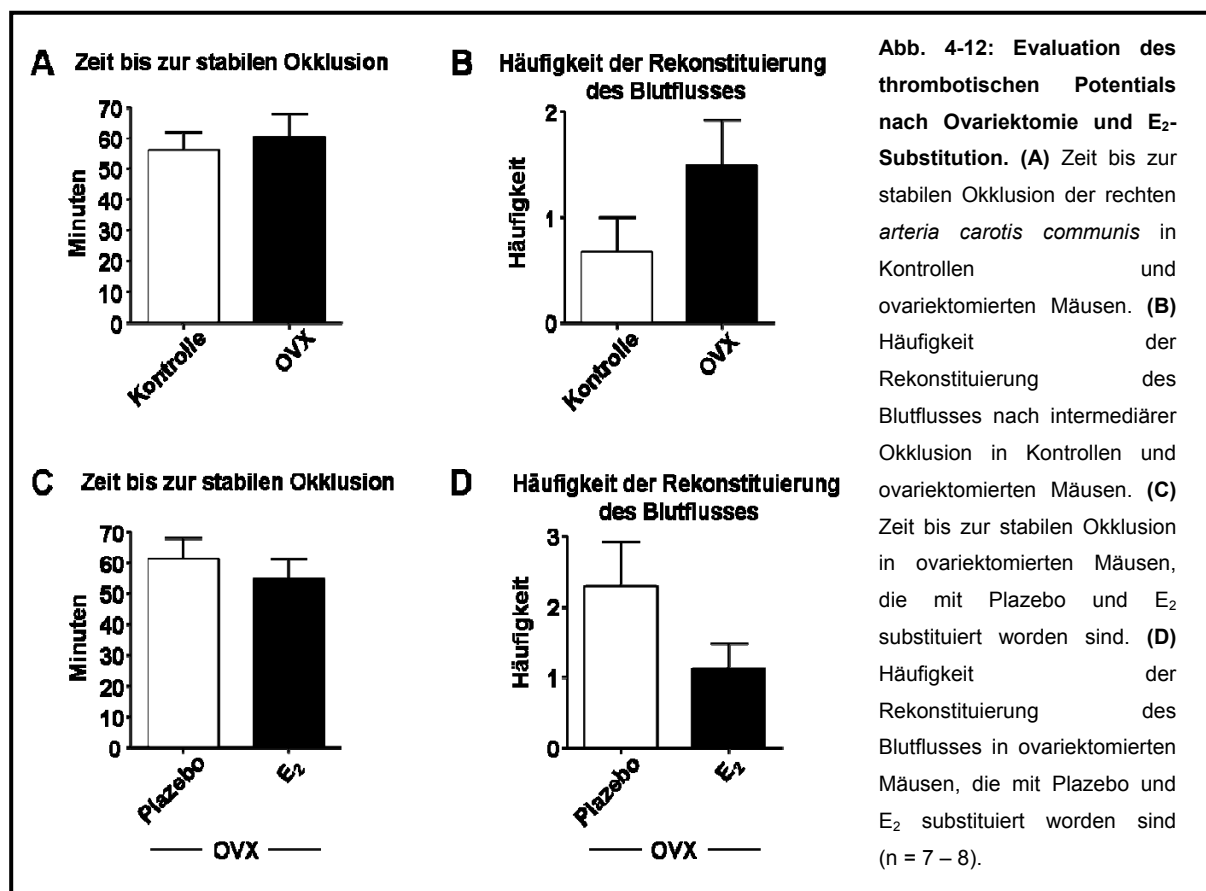


Sowohl die Messung des Blutflusses im Verlauf der Messung als auch die nachfolgende, histologische Analyse der Arterie zeigten, dass die laserinduzierte Aktivierung des Farbstoffs Rose Bengal und die dadurch ausgelöste Schädigung des Endothels zu einer vollständigen Okklusion der Arterie führten.

Interessanterweise zeigte die Zeit bis zur stabilen, okklusiven Thrombusbildung, wie in Abbildung 4-11 auf Seite 69 exemplarisch für die Gruppen „Kontrolle“ und „OVX“ dargestellt, eine ausgeprägte zirkadiane Rhythmik. Im Vergleich zu der morgendlichen Messung war die Zeit bis zur stabilen Okklusion der *arteria carotis communis* am frühen Nachmittag deutlich verkürzt. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass es bei mehreren Messungen am Tag wichtig ist, aus den unterschiedlichen Versuchsgruppen zu jedem Zeitpunkt gleich viele Tiere zu messen.



Die Analyse des thrombotischen Potentials in den verschiedenen behandelten Gruppen zeigte, dass weder die Depletion ovarieller Steroide, noch die exogene, subkutane Substitution von E₂ alleine die Thrombusbildung beeinflussten.



Die Zeit bis zur stabilen Okklusion der rechten *arteria carotis communis* als Maß für das thrombotische Potential war in diesen Gruppen annähernd identisch (Kontrolle: 56 min \pm 6 min vs. OVX: 60 min \pm 7 min; Plazebo: 61 min \pm 7 min vs. E₂: 55 min \pm 6 min, n = 7 – 8). Die Frequenz der Rekonstitution des Blutflusses jedoch war in Tieren mit intakter, ovarieller Steroidsynthese oder nach exogener E₂-Substitution im Vergleich mit ovariectomierten oder mit Plazebo substituierten Tieren mehr als halbiert, erreichte aber keine Signifikanz (Kontrolle: 0,7 \pm 0,3 vs. OVX: 1,5 \pm 0,4; Plazebo: 2,3 \pm 0,6 vs. E₂: 1,1 \pm 0,4, n = 7 – 8).

In dem beschriebenen Mausmodell konnte erstmals auch tierexperimentell ein durch Estradiol bedingtes erhöhtes kardiovaskuläres Risiko in Form einer verstärkten Atherosklerose dargestellt werden, während gleichzeitig die Thrombusbildung nur einen Trend zu einem prothrombotischen Zustand zeigte. Die pro-atherosklerotischen Effekte von E₂ korrelieren mit Daten aus klinischen Studien, die keine protektiven E₂-Effekte zeigen konnten. Darüber hinaus war E₂ in diesem Tiermodell sowohl in eine strukturelle als auch in eine zelluläre Umstrukturierung atherosklerotischer Plaques des Aortenursprungs involviert.

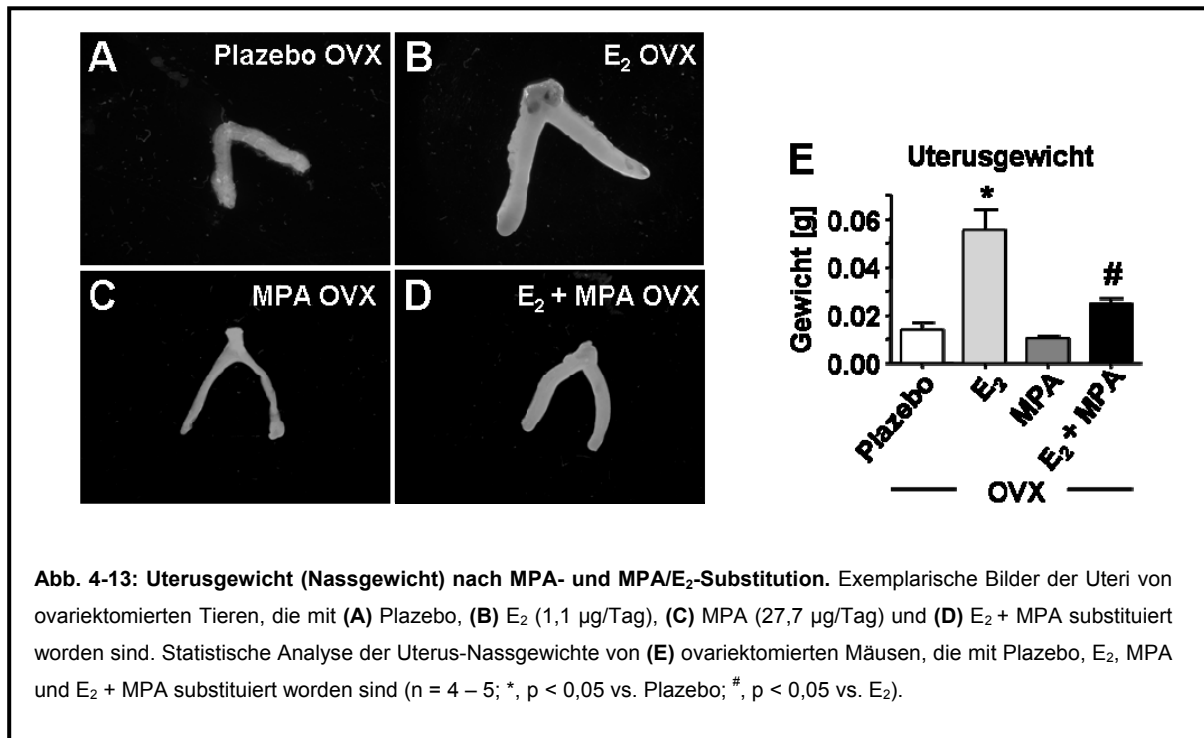
In Anlehnung an die in klinischen Studien beschriebene, mit einer kombinierten Hormonersatztherapie verbundene, erhöhte Inzidenz thromboembolischer Komplikationen wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall bei postmenopausalen Frauen, wurde das etablierte Mausmodell anschließend verwendet, um Effekte einer kombinierten Hormonsubstitution mit E₂ und MPA hinsichtlich ihrer Effekte auf die Atherothrombose zu untersuchen.

4.1.2 Effekte von Estrogen/Gestagen-Kombinationen auf die Atherothrombose im Tiermodell

4.1.2.1 Bestimmung der Uterusgewichte

Zu Beginn der Untersuchungen wurden, wie schon für die Validierung der Ovariectomie und der E₂-Substitution beschrieben, die Uterusgewichte als physiologischer Parameter zur Validierung der Hormonsubstitution mit MPA und der Kombination von MPA und E₂ am Ende der Versuchsperiode im Alter von 132 Tagen bestimmt. Wie in Abbildung 4-13 auf Seite 71 dargestellt, zeigte MPA alleine keinen Effekt auf das Uterusgewicht, antagonisierte bei Kosubstitution mit E₂ jedoch dessen

hypertrophen Effekt (Plazebo: $0,014 \text{ g} \pm 0,004 \text{ g}$ vs. MPA: $0,010 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$; E_2 : $0,056 \text{ g} \pm 0,008 \text{ g}$ vs. MPA + E_2 : $0,025 \text{ g} \pm 0,002 \text{ g}$; $n = 4 - 5$, $p < 0,05$).



4.1.2.2 Bestimmung der Körpergewichte und des Lipidprofils

Zur Beantwortung der Frage, ob die Hormonsubstitution mit MPA – alleine oder in Kombination mit E_2 – Effekte auf das Körpergewicht der Mäuse oder deren Lipidprofil hat, wurden die Tiere am Ende der experimentellen Periode gewogen und es wurden die Gesamtcholesterol- und Triglyzeridspiegel im Plasma bestimmt.

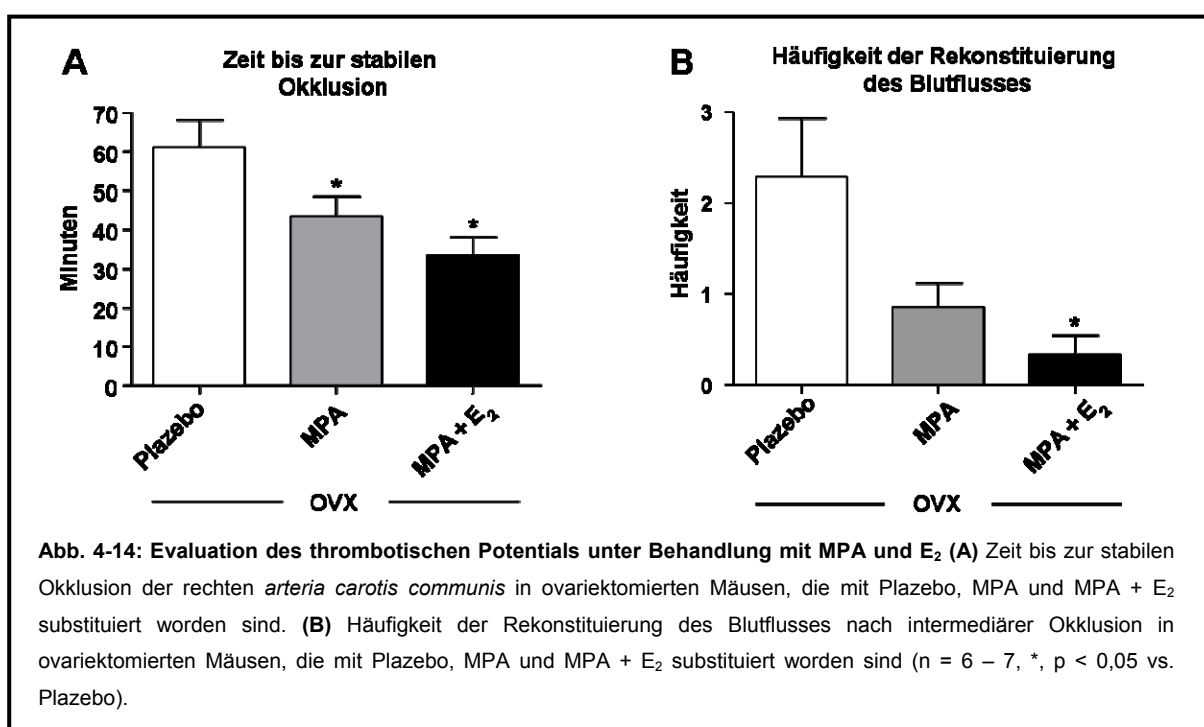
Tab. 4-2 Zusammenfassung der Körpergewichte und des Lipidprofils nach MPA- und MPA/ E_2 -Substitution. Körpergewichte, Gesamtcholesterol- und Triglyzeridspiegel von ovariectomierten Mäusen, die mit Plazebo, MPA und E_2 + MPA substituiert worden sind ($n = 8 - 20$, *, $p < 0,05$ vs. Plazebo).

	Plazebo OVX	MPA OVX	E_2 + MPA OVX
Körpergewicht [g]	35.0 ± 0.5	34.2 ± 0.6	28.7 ± 0.9 *
Gesamtcholesterol [mg/dl]	806.8 ± 80.5	893.8 ± 75.9	707.2 ± 72.2
Triglyzeride [mg/dl]	85.3 ± 14.1	106.4 ± 14.9	95.9 ± 15.1

Wie in Tabelle 4-2 auf Seite 71 dargestellt, war das Körpergewicht von mit E_2 + MPA substituierten Tieren, wie schon für die E_2 -Monosubstitution beschrieben, im Vergleich mit plazebosubstituierten Tieren signifikant reduziert (Plazebo: 35,0 g \pm 0,5 g vs. MPA + E_2 : 28,7 g \pm 0,9 g, n = 14 – 20, p < 0,05 g). Hinsichtlich der Plasmaspiegel für Gesamtcholesterol und Triglyzeride zeigte sich in keiner der Gruppen ein Unterschied.

4.1.2.3 Evaluation der Thrombusbildung

Das thrombotische Potential, das mit einer Hormonsubstitution mit MPA – alleine oder in Kombination mit E_2 – verbunden ist, wurde im Modell der laserbasierten photochemisch induzierten Thrombose evaluiert. Eine Substitution mit MPA alleine und MPA + E_2 führte zu einer signifikant verkürzten Zeit bis zur stabilen Okklusion der rechten *arteria carotis communis* (Plazebo: 61 min \pm 7 min vs. MPA: 43 min \pm 5 min bzw. MPA + E_2 : 34 min \pm 5 min, n = 6 – 7, p < 0,05). Sowohl MPA alleine als auch die kombinierte Applikation mit E_2 wirkten somit stark pro-thrombotisch. Einhergehend mit diesen Beobachtungen zeigte sich in den – mit MPA alleine oder in Kombination mit E_2 substituierten – Mäusen eine reduzierte Frequenz der Rekonstituierung des Blutflusses im Zeitintervall zwischen dem ersten, intermediären Thrombus und der stabilen Okklusion (Plazebo: 2,3 \pm 0,6 vs. MPA: 0,9 \pm 0,3 bzw. MPA + E_2 : 0,3 \pm 0,2, n = 6 – 7, p < 0,05 für Plazebo vs. MPA + E_2).

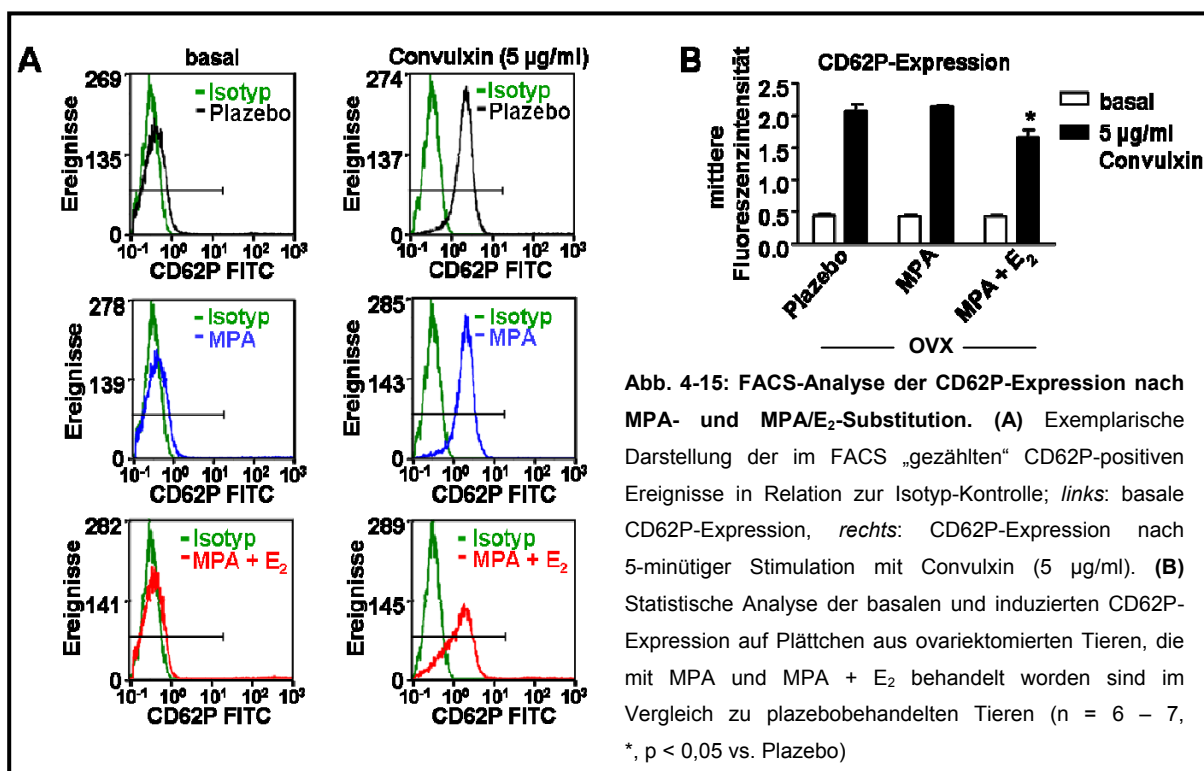


4.1.2.4 Evaluation der Plättchenaktivierung und Thrombinbildung

4.1.2.4.1 Basale und induzierte P-Selektin (CD62P)-Expression auf Plättchen

Dem prothrombotischen Effekt, der in den mit MPA und MPA + E₂ substituierten Tieren beobachtet wurde, können (i) eine erhöhte Plättchenaktivierung/-aktivierbarkeit, (ii) Änderungen in der sekundären Hämostase oder (iii) Plaque- bzw. Gefäß(wand)*remodelling* zugrunde liegen. Zur Klärung der tatsächlich zugrunde liegenden Mechanismen wurde zunächst die basale Aktivierung von Plättchen bzw. deren Aktivierbarkeit analysiert. Als Maß für die Plättchenaktivierung wurde die P-Selektin (CD62P)-Expression, einem Zelladhäsionsmolekül, das physiologisch nur auf aktivierten Plättchen und Endothelzellen exprimiert wird, bestimmt.

Nach Gewinnung von plättchenreichem Plasma wurde zunächst der Gehalt an Plättchen über Quantifizierung der Plättchen-Glykoprotein IIb (CD41)-positiven Zellen im PRP bestimmt. Die FACS-Analyse bestätigte in den PRP-Proben aller Gruppen einen Plättchengehalt von 98 % - 99 %.

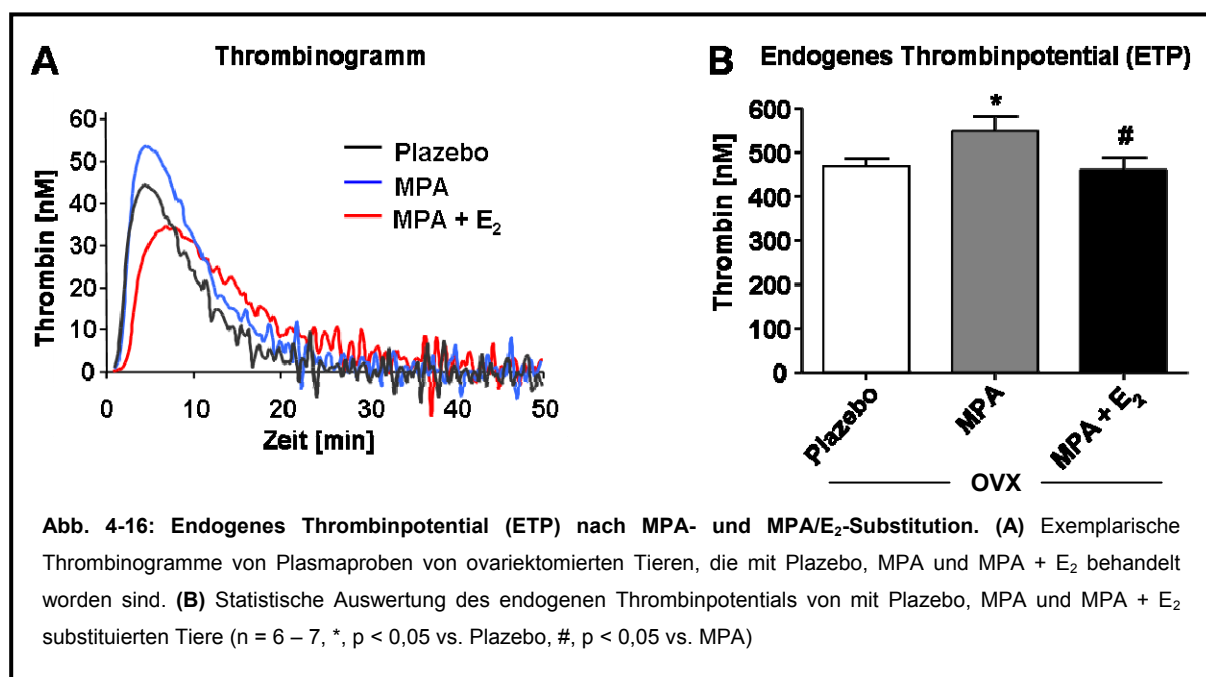


Die basale CD62P-Expression auf den Plättchen im PRP als Parameter für eine intrinsische Plättchenaktivierung war zwischen den Gruppen „Plazebo“, „MPA“ und „MPA + E₂“ identisch. Zur Evaluation einer eventuell beschleunigten Aktivierbarkeit der Plättchen in den unterschiedlichen Gruppen wurde die CD62P-Expression nach

Aktivierung mit Convulxin (5 µg/ml), dem Gift der Klapperschlange, bestimmt. Es zeigte sich, dass die Aktivierbarkeit der Plättchen weder in der Gruppe der mit MPA behandelten Tiere noch in der Gruppe der mit MPA + E₂ substituierten Tiere erhöht war; in der kombiniert substituierten Gruppe zeigte sich im Vergleich mit plazebobehandelten Tieren sogar eine reduzierte Aktivierbarkeit nach Convulxin-Stimulation.

4.1.2.4.2 Endogenes Thrombinpotential in plättchenarmem Plasma

Neben einer erhöhten Plättchenaktivierung oder einer gesteigerten Plättchen-Aktivierbarkeit als möglichem Mechanismus für prothrombotische Effekte kann auch eine gestörte Gerinnungshämostase einem prothrombotischen Phänotyp zugrunde liegen. Zur Analyse der Hämostase wurde das endogene Thrombinpotential (ETP), die maximale Thrombingenerierung durch die in plättchenarmem Plasma gelösten Gerinnungsfaktoren, bestimmt.

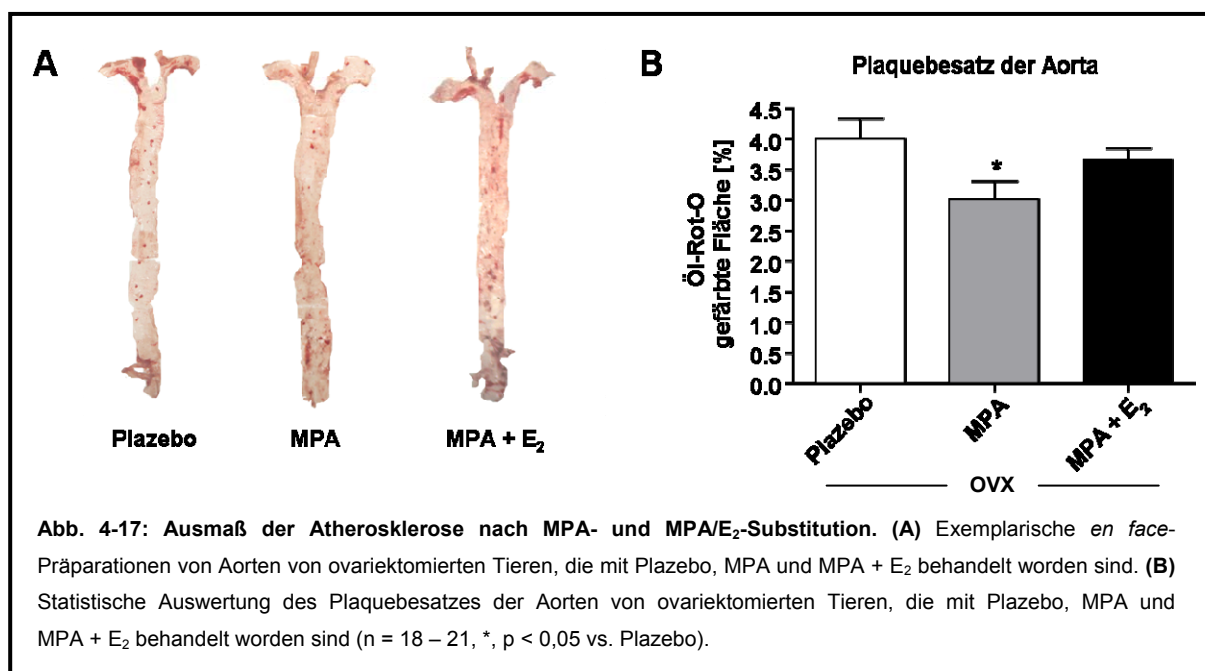


Wie in Abbildung 4-16 dargestellt, war die Fähigkeit zur maximalen Thrombingenerierung im Plasma von mit MPA behandelten Tieren im Vergleich zum Plasma von mit Placebo oder mit MPA + E₂ substituierten Tieren signifikant erhöht (Placebo: 467 nM ± 19 nM vs. MPA: 549 nM ± 34 nM, n = 6 – 7, p < 0,05; MPA: 549 nM ± 34 nM vs. MPA + E₂: 460 nM ± 29 nM, n = 6 – 7, p < 0,05), während

gleichzeitig die ETPs von mit Plazebo und MPA + E₂ substituierten Tieren nicht voneinander verschieden waren.

4.1.2.5 Ausmaß der Atherosklerose

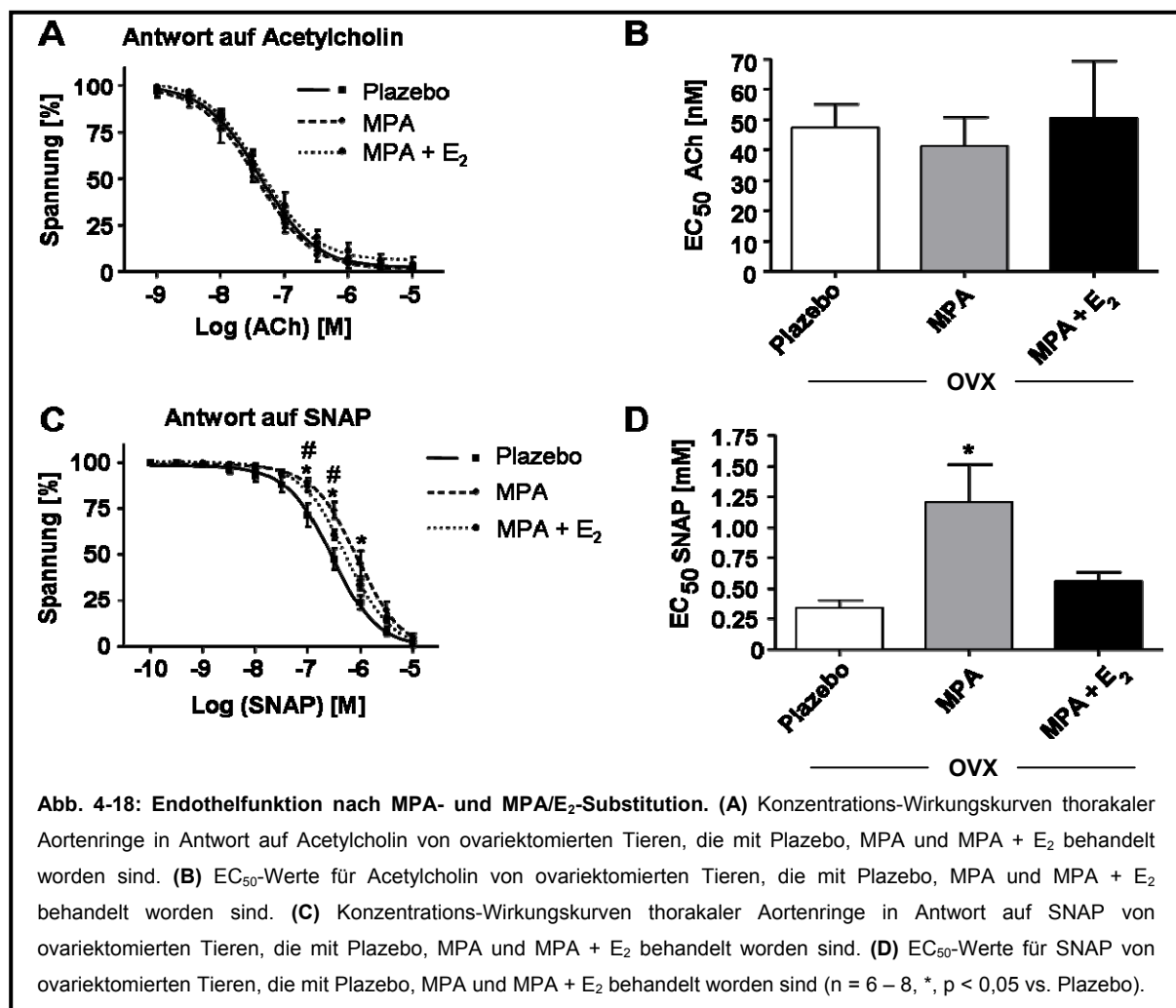
Um Mechanismen zu ergründen, die auch den prothrombotischen Effekt bei kombinierter Substitution von MPA + E₂ erklären würden, wurde das Ausmaß der Atherosklerose in *en face*-Präparationen von Aorten analysiert. Die Quantifizierung des Plaquebesatzes in den Aorten zeigte aber weder in der Gruppe der mit MPA behandelten Tiere noch in der Gruppe der mit MPA + E₂ behandelten Tiere eine verstärkte Atherosklerose. Interessanterweise war in den mit MPA behandelten Tieren der Plaquebesatz im Vergleich zum Besatz plazebobehandelter Tiere sogar signifikant reduziert, während das Ausmaß der Atherosklerose in den Gruppen, die mit Plazebo oder MPA + E₂ behandelt worden waren, annähernd identisch war (Plazebo: 4 % ± 0,3 % vs. MPA: 3 % ± 0,3 %, n = 18 – 21, p < 0,05; Plazebo: 4 % ± 0,3 % vs. MPA + E₂: 3,7 % ± 0,2 %, n = 18 – 20).



4.1.2.6 Endothelfunktion

Ein anderer Mechanismus, über den pro-thrombotische Wirkungen einer kombinierten Substitution mit MPA + E₂ vermittelt werden könnten, ist eine Dysfunktion des Endothels, die einer manifesten Atherosklerose vorausgehen kann,

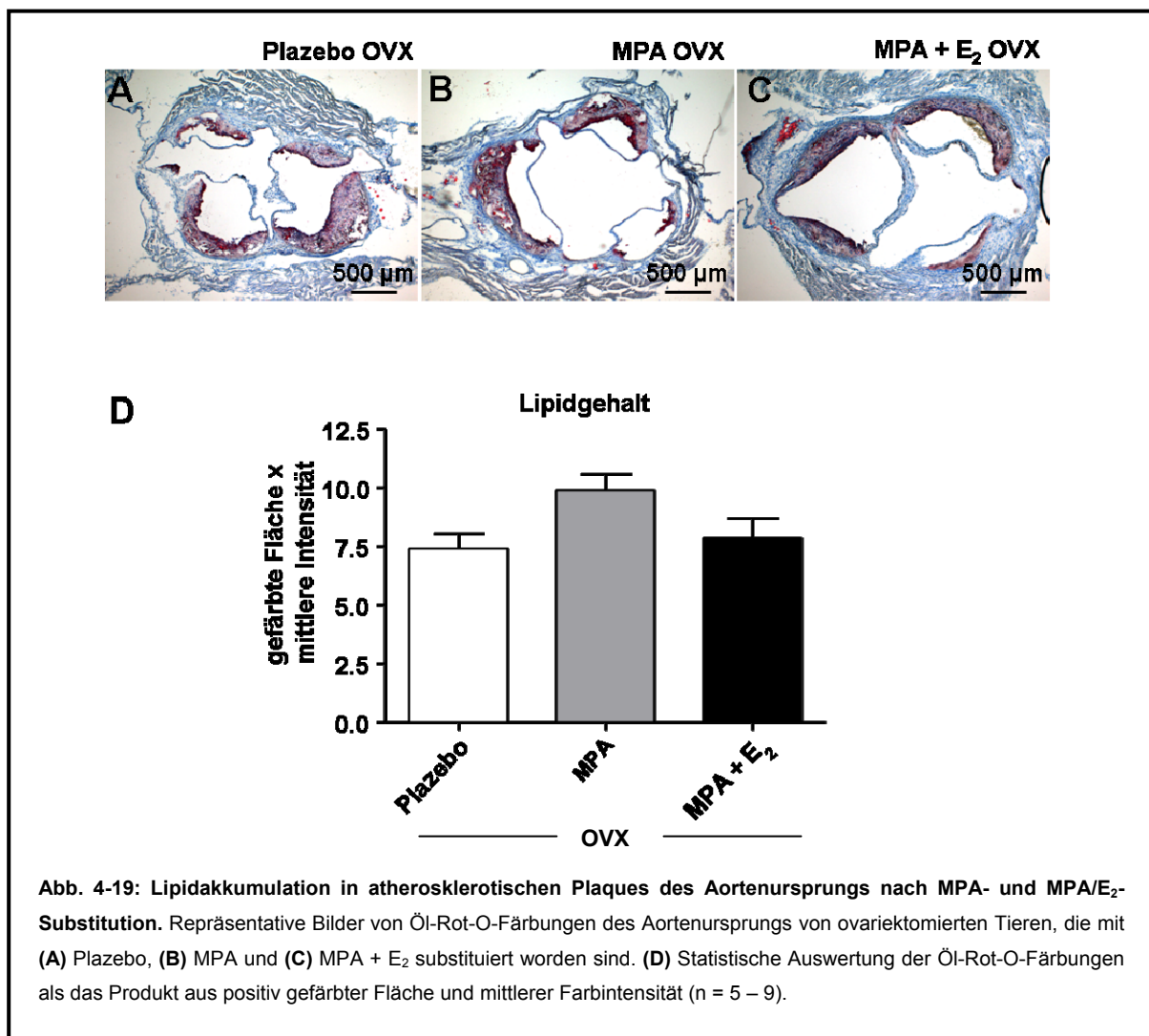
was erklären würde, dass sich keine Unterschiede im Ausmaß atherosklerotischer Ablagerungen in Gefäßen zwischen den Gruppen „Plazebo“ und „MPA + E₂“ zeigen. Die Evaluation der Endothelfunktion erfolgte in Organbadversuchen an isolierten, thorakalen Aortenringen. Die endothelabhängige Relaxation wurde nach halbmaximaler Vorkontraktion mit Phenylephrin durch kumulative Zugabe von Acetylcholin analysiert; die endothelunabhängige Relaxation wurde durch Zugabe des exogenen NO-Donors S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP) evaluiert. In keiner der Gruppen „Plazebo“, „MPA“ oder „MPA + E₂“ zeigte sich ein Unterschied hinsichtlich der acetylcholininduzierten endothelabhängigen Vasorelaxation. Die endothelunabhängige Relaxation in Antwort auf den exogenen NO-Donor SNAP war überraschenderweise in der MPA-Gruppe im Vergleich zu der Gruppe plazebobehandelter Tiere jedoch deutlich verschlechtert (Plazebo: 335 nM ± 69 nM vs. MPA: 1204 nM ± 314 nM, n = 6 – 8, p < 0,05; Plazebo: 335 nM ± 69 nM vs. MPA + E₂: 557 nM ± 77 nM, n = 6 – 8).



4.1.2.7 Plaquemorphologie

4.1.2.7.1 Lipidgehalt atherosklerotischer Plaques des Aortenursprungs

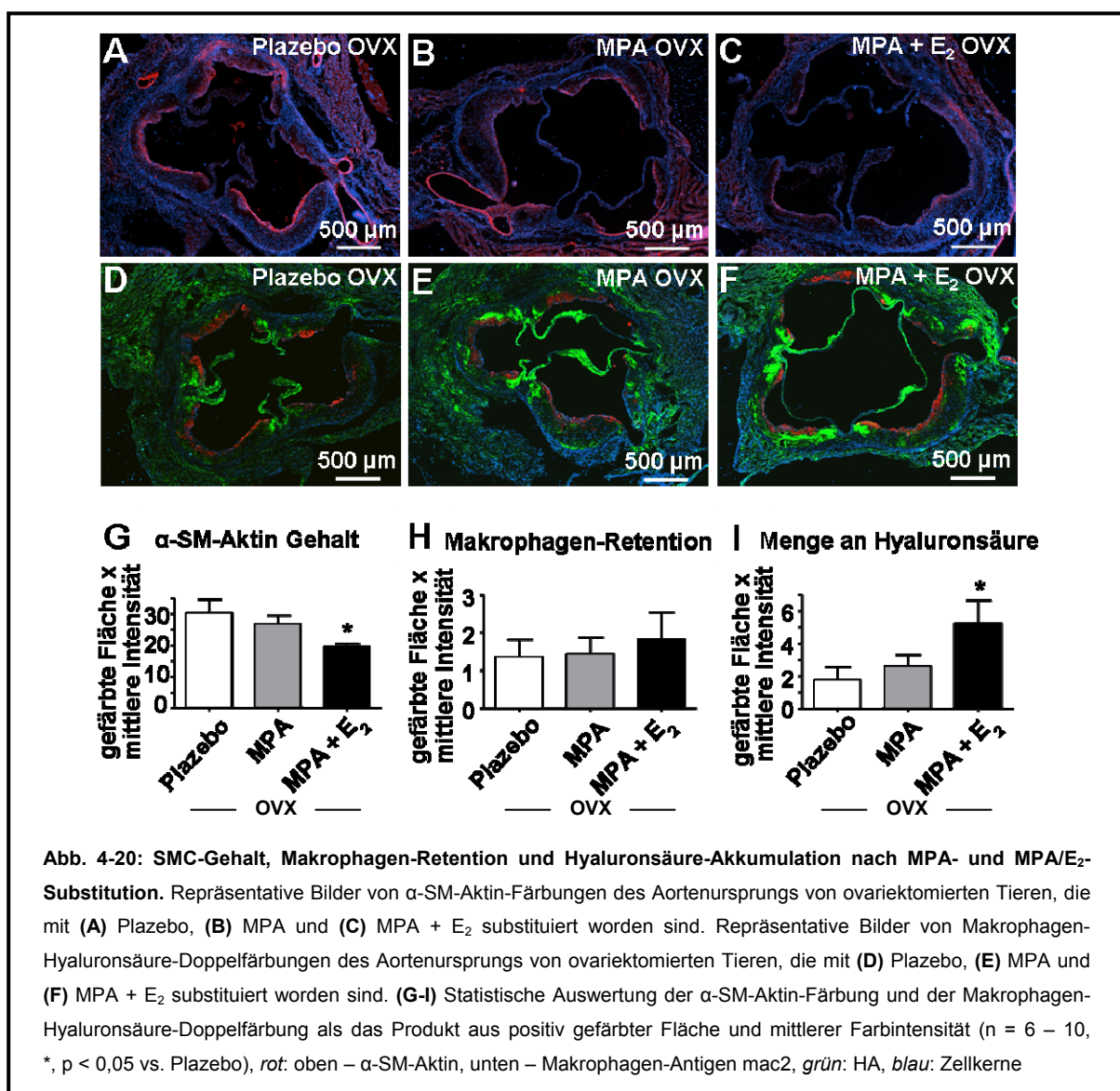
Der Lipidgehalt innerhalb eines Plaques korreliert stark mit seiner Stabilität: Je mehr Lipidakkumulation innerhalb eines Plaques manifest wird, desto anfälliger ist dieser für eine Ruptur. In keiner der Gruppen der mit Plazebo, MPA oder MPA + E₂ substituierten Tiere zeigten sich jedoch signifikant voneinander verschiedene Lipidgehalte der Plaques des Aortenursprungs.



4.1.2.7.2 SMC-Invasion, Makrophagen-Retention und Hyaluronsäure-Akkumulation

Neben der Anreicherung von Lipiden sind weitere, strukturelle Komponenten wie z.B. das Matrixmolekül Hyaluronsäure, aber auch zelluläre Komponenten wie Makrophagen oder glatte Muskelzellen entscheidend für die Stabilität eines Plaques.

Als Maß für die Präsenz von glatten Gefäßmuskelzellen in der fibrotischen Kappe der atherosklerotischen Plaques wurden Präparate des Aortenursprungs mit dem für differenzierte, glatte Muskelzellen spezifischen Marker α -SM-Aktin gefärbt. In den Plaques der mit MPA + E₂ substituierten Tiere zeigte sich im Vergleich zu den Plaques plazebosubstituierter Tiere eine signifikant reduzierte Menge α -SM-Aktin-positiver Zellen (Plazebo: $30,3 \pm 4,4$ vs. MPA + E₂: $19,6 \pm 0,8$, $n = 6 - 10$, $p < 0,05$). Tendenziell zeigte sich eine reduzierte Menge glatter Muskelzellen auch in der Gruppe der nur mit MPA behandelten Tiere.



Hinsichtlich der Retention von Makrophagen zeigte sich in keiner der Gruppen ein Unterschied. Strukturell konnte aber mit Hinblick auf die Akkumulation von Hyaluronsäure ein signifikanter Anstieg in den Plaques von Tieren, die mit MPA + E₂

behandelt wurden, beobachtet werden (Plazebo: $1,8 \pm 0,8$ vs. MPA + E₂: $5,3 \pm 1,4$, $n = 6 - 10$, $p < 0,05$). Wie schon für die α -SM-Aktin-Färbung beschrieben, wurde eine Tendenz zu erhöhter HA-Akkumulation auch in den mit MPA monosubstituierten Tieren beobachtet.

4.2 Effekte von Estradiol auf humane, glatte Gefäßmuskelzellen

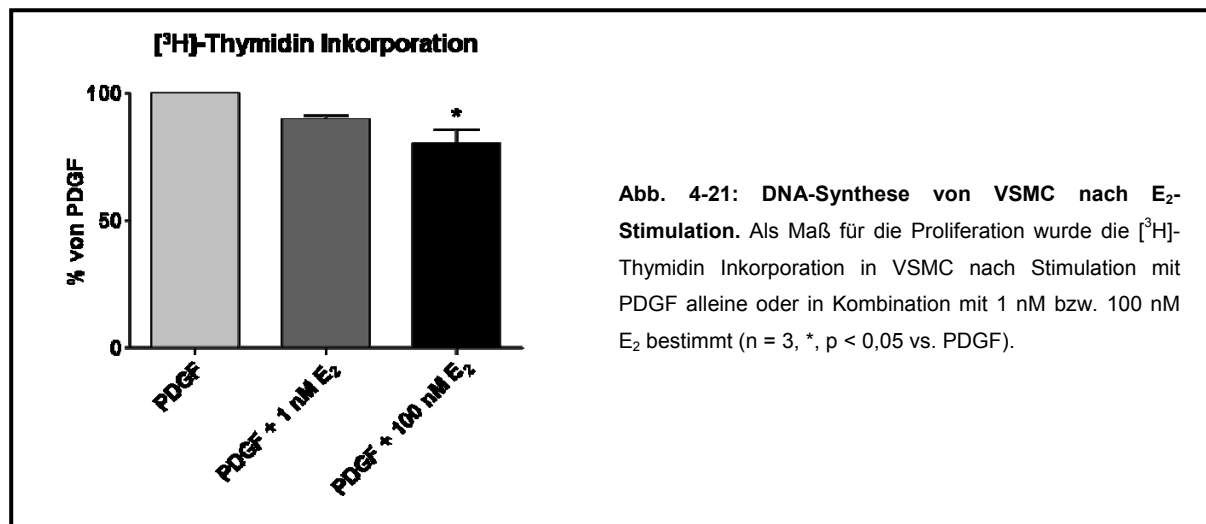
Interessanterweise zeigte E₂ alleine und in Kombination mit MPA im Tierversuch eine Reduktion der durch Ovariectomie induzierten Erhöhung α -SM-Aktin positiver Zellen in der fibrotischen Kappe atherosklerotischer Plaques des Aortenursprungs. Der reduzierte Gehalt α -SM-Aktin positiver Zellen in der fibrotischen Kappe von Tieren mit endogener, ovarieller Steroidsynthese (Kontrolle) und in den Gruppen, in denen E₂ substituiert wurde, ist vermutlich auf durch E₂ vermittelte Effekte auf das proliferative und/oder migratorische Verhalten von VSMC oder aber die Differenzierung von VSMC zurückzuführen.

Um *in vitro* mechanistische Studien zu „im atherosklerotischen Kontext“ durch Estradiol vermittelte Effekte auf VSMC durchführen zu können, wurden humane VSMC mit PDGF-BB stimuliert. PDGF-BB ist ein Wachstumsfaktor, der im Zuge der Atherosklerose massiv ansteigt und ein bekanntes Mitogen für eine Vielzahl von Zellen, u.a. VSMC, darstellt und dessen Rezeptoren in atherosklerotischen Plaques aufreguliert werden. Die Stimulation humaner glatter Gefäßmuskelzellen erfolgte mit PDGF-BB alleine oder in Kombination mit 1 nM bzw. 100 nM Estradiol.

4.2.1 Proliferative Kapazität

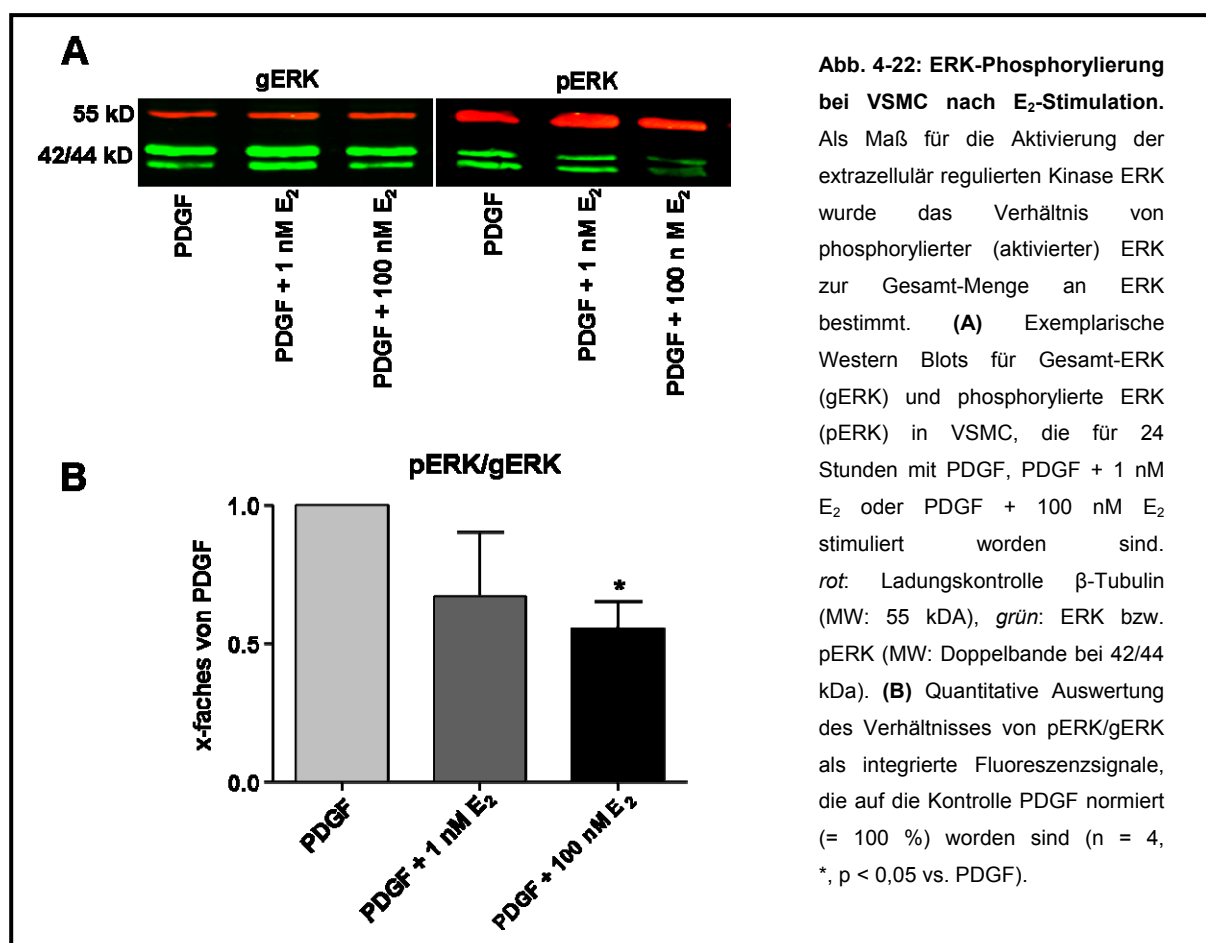
Die so stimulierten VSMC wurden zunächst hinsichtlich des funktionellen Parameters „Proliferation“ analysiert.

Es bestätigte sich – in Einklang mit den Literaturdaten –, dass mit E₂ und PDGF ko-stimulierte Zellen eine graduell reduzierte Proliferation zeigten. Die Proliferation war in mit 1 nM E₂ stimulierten VSMC um 10 % reduziert. In Zellen, die mit 100 nM E₂ stimuliert worden waren, zeigte sich eine 20 %-ige Reduktion der proliferativen Kapazität (PDGF: 100 % vs. PDGF + 1 nM E₂: $90 \% \pm 1 \%$, PDGF + 100 nM E₂: $80 \% \pm 5 \%$, $n = 3$, *, $p < 0,05$).



4.2.2 Regulation der extrazellulär regulierten Kinase (ERK)

Mechanistisch stellt sich die Frage, welche Signaltransduktionskaskaden in die reduzierte, proliferative Kapazität der VSMC involviert sind. In diesem Kontext ist die Regulation der Phosphorylierung der extrazellulär regulierten Kinase ERK von großer Bedeutung.



Phosphorylierte ERK ist ein essentieller Mediator der Signalgebung im Rahmen der Stimulation von Proliferation und Migration. Abbildung 4-22 auf Seite 80 zeigt exemplarische WesternBlots sowie die quantitative Analyse von vier unabhängigen Experimenten. Einhergehend mit der reduzierten DNA-Synthese konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation mit Estradiol eine nachhaltige, reduzierte Phosphorylierung von ERK im Verhältnis zur Gesamt-ERK-Menge vorliegt (PDGF: 100 %, PDGF + 100 nM Estradiol: 55,6 % \pm 9,7 %, n = 4, p < 0,05 vs. PDGF).

4.2.3 Hyaluronsäure-Sekretion und relative Molekulargewichtsverteilung

Es ist bekannt, dass PDGF-BB die HA-Synthese in VSMC induziert und dadurch deren proliferative und migratorische Kapazität erhöhen kann. Darüber hinaus wurde beschrieben und konnte auch in unseren Experimenten bestätigt werden, dass E₂ den durch PDGF-BB induzierten pro-proliferativen Phänotyp inhibieren kann. Welche Rolle E₂ jedoch bezogen auf die durch PDGF-BB induzierte Hyaluronsäure-Sekretion und -Synthese in VSMC spielt, ist ungeklärt. Wie einleitend beschrieben, wird Hyaluronsäure während der Synthese durch die jeweilige Isoform in den Extrazellulärraum extrudiert und kommt sowohl perizellulär als auch extrazellulär in dem die Zellen umgebenden Medium vor. Um zu evaluieren, ob E₂ die Sekretion von Hyaluronsäure in das Medium reduziert, wurde die in das Medium sezernierte HA mittels ELISA bestimmt. Anschließend wurde die gemessene HA-Menge auf die Gesamtproteinmenge (Zellen) bezogen.

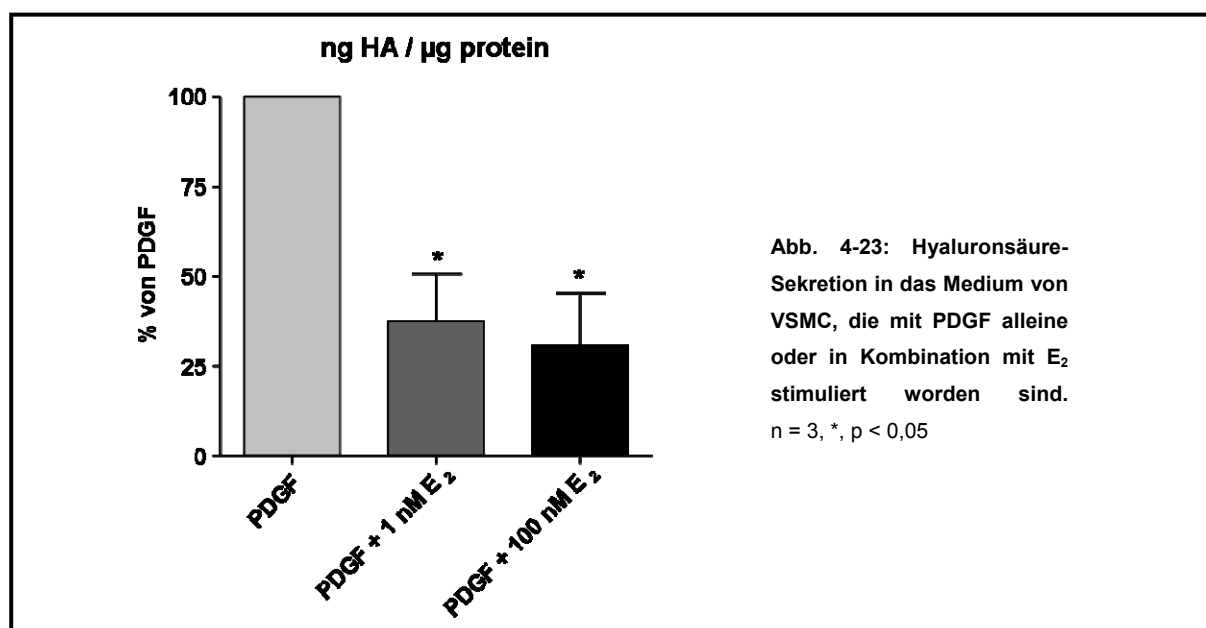
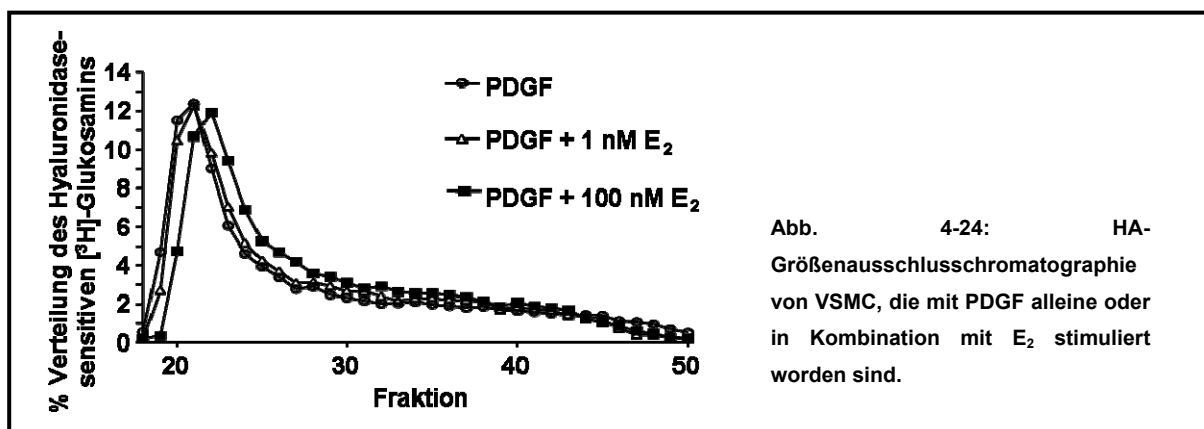


Abbildung 4-23 auf Seite 81 zeigt eine massive Reduktion der HA-Sekretion in VSMC durch E_2 . Zur Bestimmung des Molekulargewichts der in das Medium sezernierten HA wurde eine Gelchromatographie durchgeführt. Die Molekulargewichtsverteilung der in das Medium sezernierten Hyaluronsäure verschob sich durch 100 nM E_2 leicht in Richtung niedermolekularerer Größenordnungen. Abbildung 4-24 zeigt das Elutionsprofil der HA-Größenchromatographie als Prozentsatz der Verteilung des Hyaluronidase-sensitiven in hochmolekulare Polymere (HA) inkorporierten [3H]-Glukosamins im Medium.



4.2.4 Immunzytochemie

Zur Analyse phänotypischer Veränderungen nach Stimulation mit PDGF alleine oder in Kombination mit E_2 wurden VSMC mittels Immunzytochemie für HA und Zellkerne gefärbt.

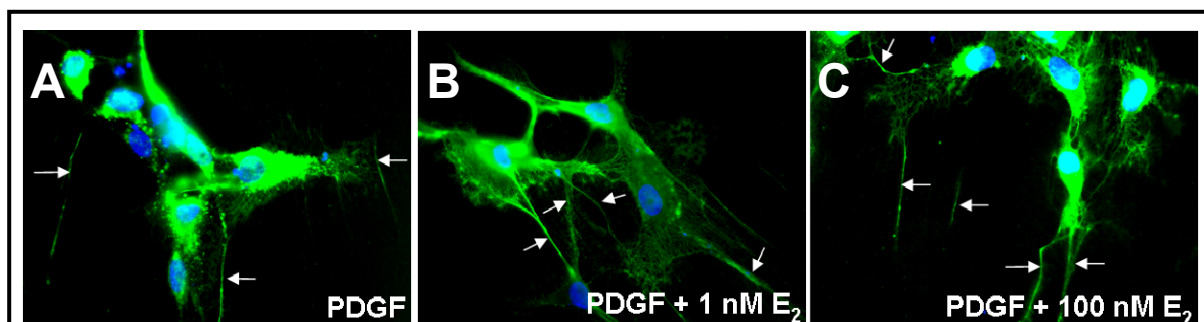


Abb. 4-25: Immunzytochemie für HA (grün) und Zellkerne (blau). Zur Analyse morphologischer Veränderungen und Veränderungen in der perizellulären HA-Matrix wurden VSMC nach Stimulation mit (A) PDGF, (B) PDGF + 1 nM E_2 und (C) PDGF + 100 nM E_2 immunzytochemisch analysiert. Die weißen Pfeile markieren perizelluläre HA-Fäden.

Die immunzytochemische Analyse der mit PDGF alleine und in Kombination mit E₂ stimulierten VSMC zeigte, dass sich prinzipiell von allen Zellen lange perizelluläre HA-Kabel erstreckten (weiße Pfeile). Wie in Abbildung 4-25 auf Seite 82 dargestellt, zeigten sich jedoch keine deutlichen Unterschiede in Quantität und Qualität der perizellulären HA-Matrix nach E₂-Stimulation.

4.2.5 Hyaluronsäuresynthese mRNA-Expression

Um die Frage zu beantworten, in welchem Zusammenhang die reduzierte HA-Sekretion mit der mRNA-Expression der die Hyaluronsäure synthetisierenden Enzyme (HAS1 - 3) und der die Hyaluronsäure degradierenden Enzyme (Hyal1 - 2) steht, wurde die mRNA-Expression von HAS1 - 3 sowie Hyal1 und Hyal2 analysiert. Die Analyse der *real-time-PCR* der mRNA zeigte, dass – im Vergleich zu mit PDGF stimulierten Zellen – VSMC, die mit PDGF und E₂ stimuliert worden waren, eine signifikant reduzierte Expression von HAS1, HAS2 und Hyal1 zeigten (**HAS1** - PDGF: 100 % vs. PDGF + 1 nM E₂: 57 % ± 15 %, PDGF + 100 nM E₂: 58 % ± 16 %, n = 7, p < 0,05; **HAS2** - PDGF: 100 % vs. PDGF + 100 nM E₂: 79 % ± 6 %, n = 7, p < 0,05; **Hyal1** - PDGF: 100 % vs. PDGF + 1 nM E₂: 77 % ± 9 %, PDGF + 100 nM E₂: 78 % ± 6 %; n = 7, *, p < 0,05).

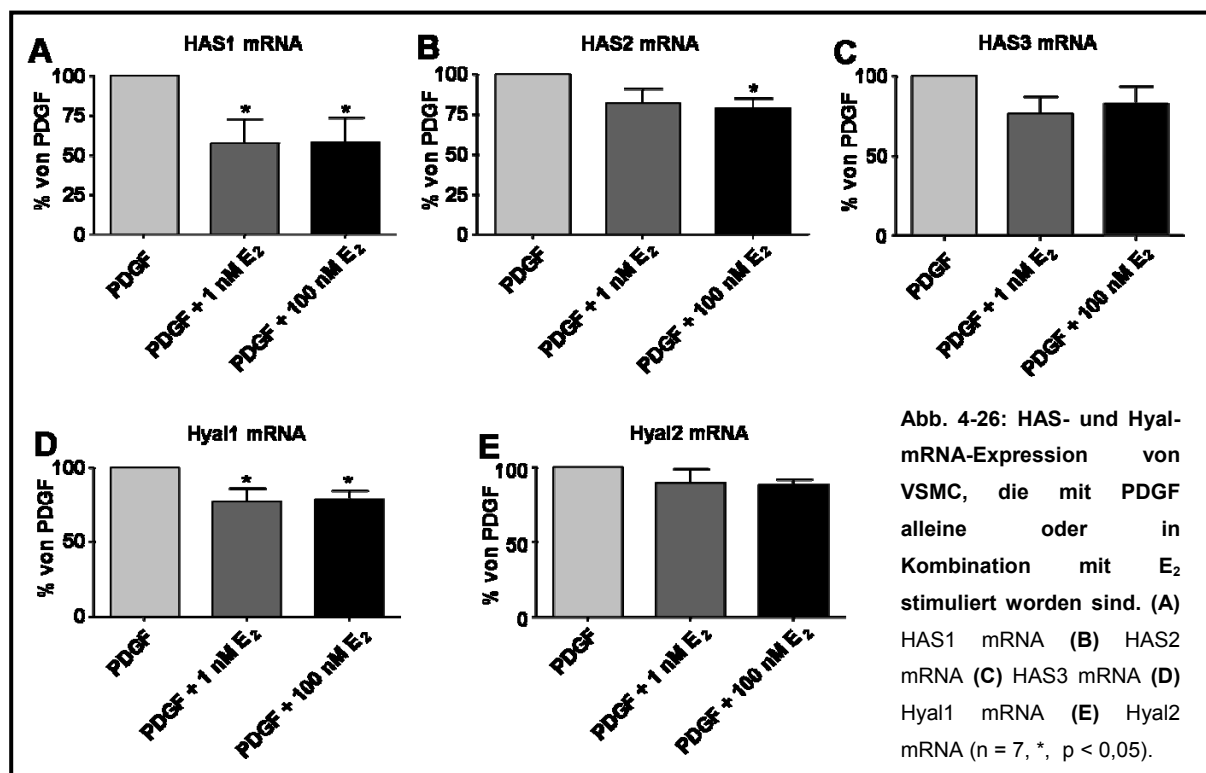
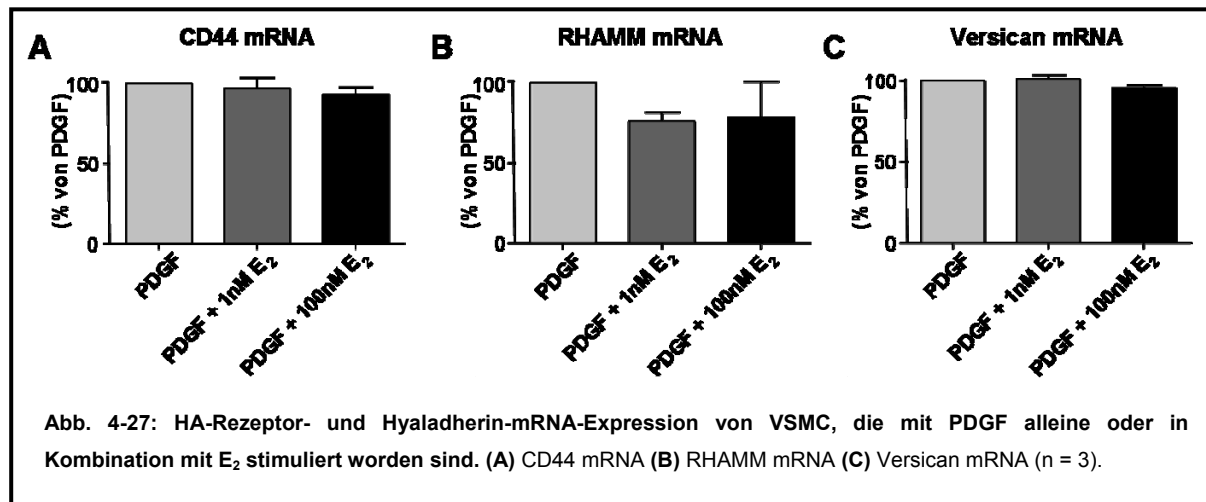


Abbildung 4-27 zeigt, dass aber weder die mRNA-Expression der HA-Rezeptoren CD44 oder RHAMM noch die des Hyaladherins Versican durch E₂ beeinflusst wurde. Dies macht deutlich, dass E₂ unter den gewählten experimentellen Bedingungen spezifisch die HA-Synthese beeinflusst.

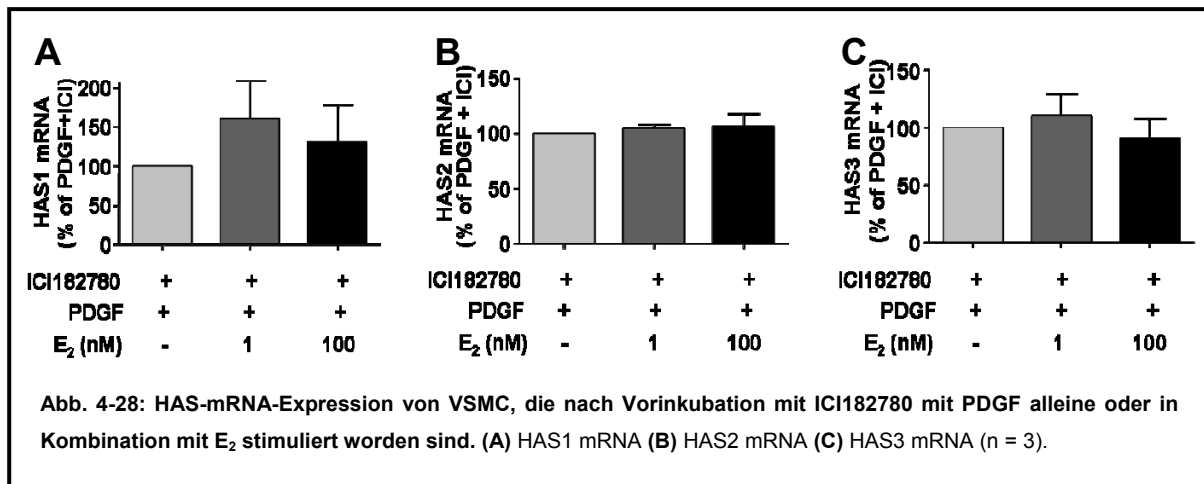


4.2.6 *in silico* Analyse der HAS1- und HAS2-Promotorregionen

Zur Identifikation möglicher estrogenresponsiver Elemente (ERE) in den Promotorregionen von HAS1 und HAS2 wurde eine *in silico* Analyse vorgenommen. Hierzu wurde die Region 1000bp oberhalb des Transkriptionsstarts jedes der beiden Gene als putative Promotorregion angenommen und mit der PROMO Datenbank (Farre *et al.*, 2003; Messeguer *et al.*, 2002) analysiert. Interessanterweise konnten 4 ERE in der Promotorregion des HAS1-Gens identifiziert werden, während kein ERE in der HAS2-Promotorregion detektiert wurde. Das Vorhandensein von estrogenresponsiven Elementen ist Evidenz dafür, dass es sich bei der beobachteten reduzierten HAS1-mRNA-Expression um einen direkten genomischen Mechanismus handeln könnte, bei dem Estrogen/Estrogenrezeptorkomplexe an die *in silico* detektierten ERE binden und so die Transkription direkt beeinflussen. Beide Promotorregionen wiesen darüber hinaus Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NFκB und CREB auf, die bekannte Transkriptionsfaktoren am Ende des ERK/MAPK-Signaltransduktionswegs sind.

4.2.7 Estrogenrezeptor-Abhängigkeit

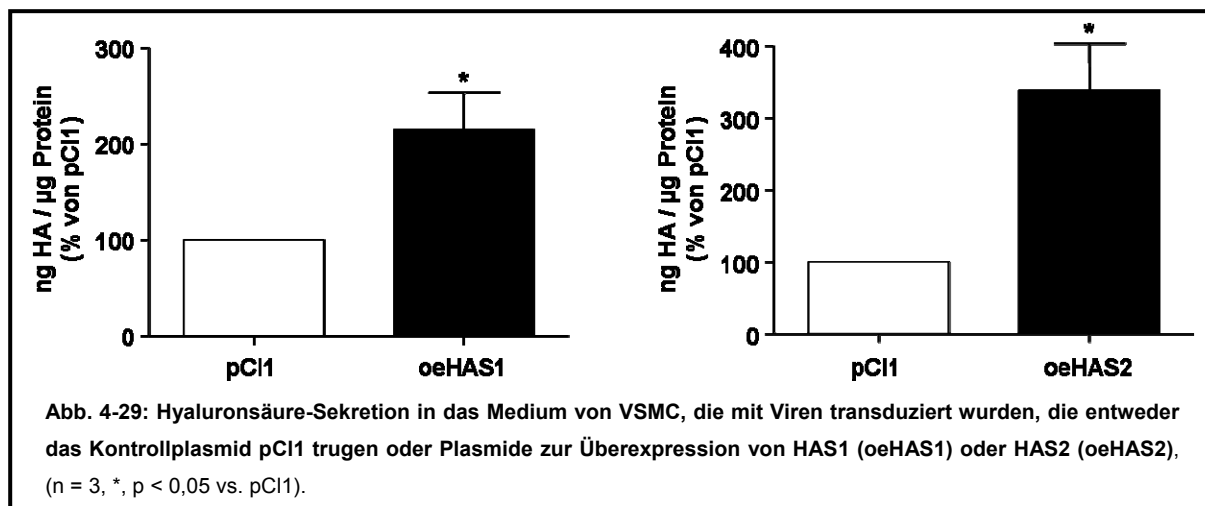
Zur Klärung der Frage, ob die beobachtete reduzierte Expression von HAS1 aber auch HAS2 estrogenrezeptorabhängig ist, wurden VSMC mit dem Estrogenrezeptor α - und β -Antagonisten ICI182780 vorinkubiert und anschließend stimuliert.



Wie in Abbildung 4-28 dargestellt, wurde sowohl die durch E₂ reduzierte mRNA Expression von HAS1 als auch von HAS2 durch die Vorinkubation mit ICI182780 antagonisiert. Die Inhibition der Expression von HAS1 und HAS2 scheint somit estrogenrezeptorabhängig reguliert zu werden.

4.2.8 Lentivirale Überexpression von HAS1 und HAS2

Zur Evaluation der Frage, ob die durch E₂ reduzierte HAS-mRNA Expression auch für die verringerte, proliferative Aktivität der VSMC verantwortlich ist, wurden beide HAS-Isoformen separat durch lentivirale Vektoren überexprimiert. Die Überexpression wurde dabei so durchgeführt, dass die nach Überexpression des jeweiligen Isoenzym ins Medium sezernierte Menge an HA im gleichen Konzentrationsbereich lag (Abbildung 4-29, Seite 86), um einen Vergleich der Effekte der durch die beiden Isoenzyme synthetisierten HA zu ermöglichen.

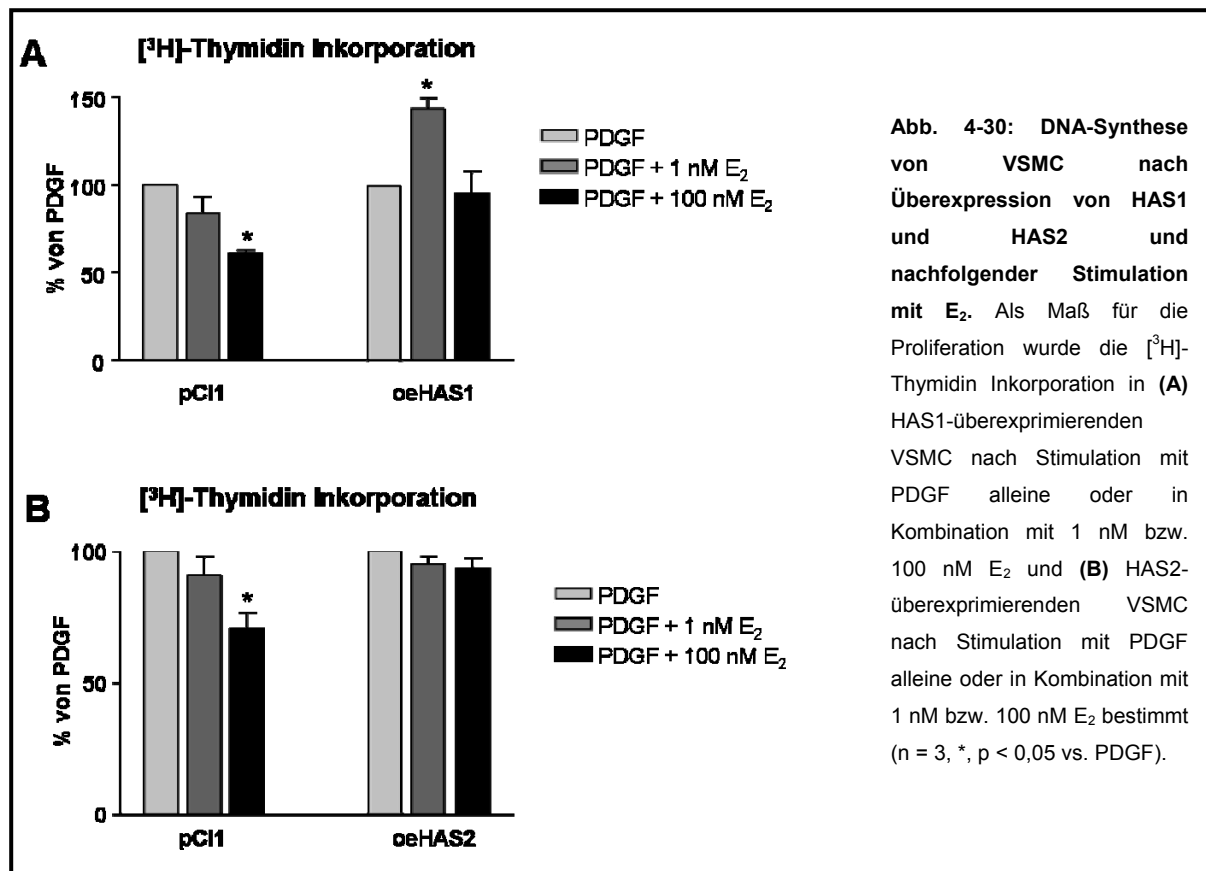


Nach Validierung der Überexpression im Vergleich von mit pCI1 transduzierten sowie HAS1 bzw. HAS2 überexprimierenden Zellen wurde die proliferative Kapazität in überexprimierenden Zellen nach Stimulation mit PDGF-BB alleine oder in Kombination mit Estradiol evaluiert.

4.2.8.1 Proliferation

Wie in Abbildung 4-30 auf Seite 87 dargestellt, zeigte sich eine reduzierte Proliferation nach Kostimulation mit PDGF und E₂ – im Vergleich zu PDGF alleine – erwartungsgemäß auch bei den mit pCI1 transduzierten Zellen (PDGF: 100 %, PDGF + 1 nM Estradiol: 84,0 % ± 9,4 %, PDGF + 100 nM Estradiol: 61 % ± 1,9 %, n = 3, p < 0,05). Durch Überexpression von HAS1 wurde die reduzierte Proliferation von mit PDGF + 1 nM E₂ stimulierten Zellen in der pCI1-Gruppe kompensiert; auch bei Kostimulation von VSMC mit PDGF und 100 nM E₂ zeigte sich in den HAS1 überexprimierenden Zellen eine proliferative Aktivität, die der mit PDGF stimulierten Zellen entsprach und im Vergleich zu den mit PDGF und 100 nM E₂ stimulierten Zellen der pCI1-Gruppe deutlich erhöht war (PDGF: 100 %, PDGF + 1 nM Estradiol: 143,4 % ± 6,4 %, PDGF + 100 nM Estradiol: 95,4 % ± 12,2 %, n = 3). Im Vergleich zu PDGF alleine konnte auch in den experimentellen Gruppen zur HAS2-Überexpression eine reduzierte Proliferation in den mit pCI1 transduzierten Zellen nach Kostimulation mit PDGF und E₂ – im Vergleich zu PDGF alleine – gezeigt werden (PDGF: 100 %, PDGF + 1 nM Estradiol: 91,2 % ± 7,0 %, PDGF + 100 nM Estradiol: 70,8 % ± 6,2 %, n = 3, p < 0,05). Durch Überexpression von HAS2 wurde die reduzierte, proliferative Aktivität bei mit PDGF + 1 nM E₂ und PDGF + 100 nM E₂ stimulierten Zellen auf das Niveau der mit PDGF stimulierten Zellen gesteigert

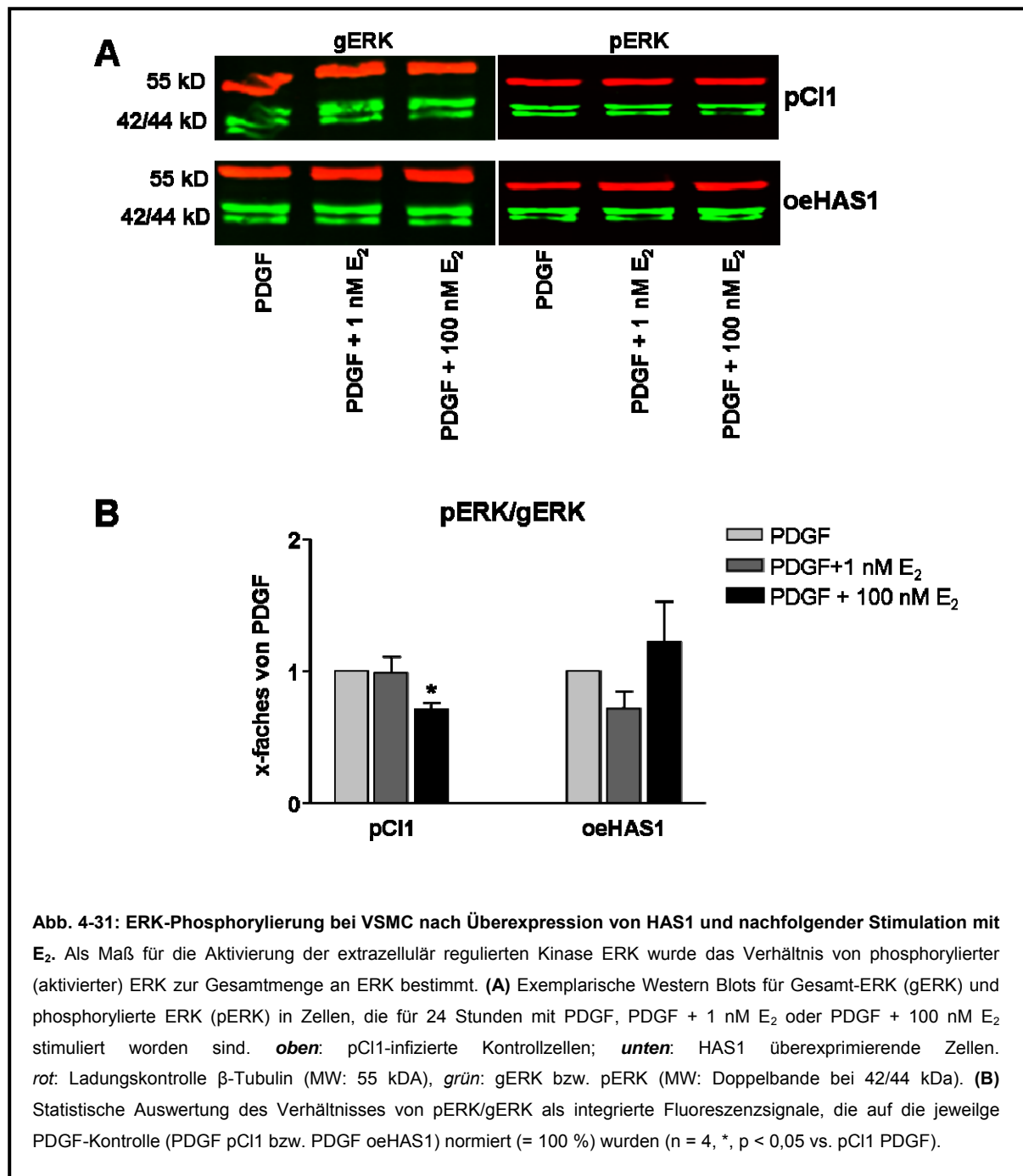
(PDGF: 100 %, PDGF + 1 nM Estradiol: 95,2 % \pm 3,1 %, PDGF + 100 nM Estradiol: 93,7 % \pm 3,9 %).



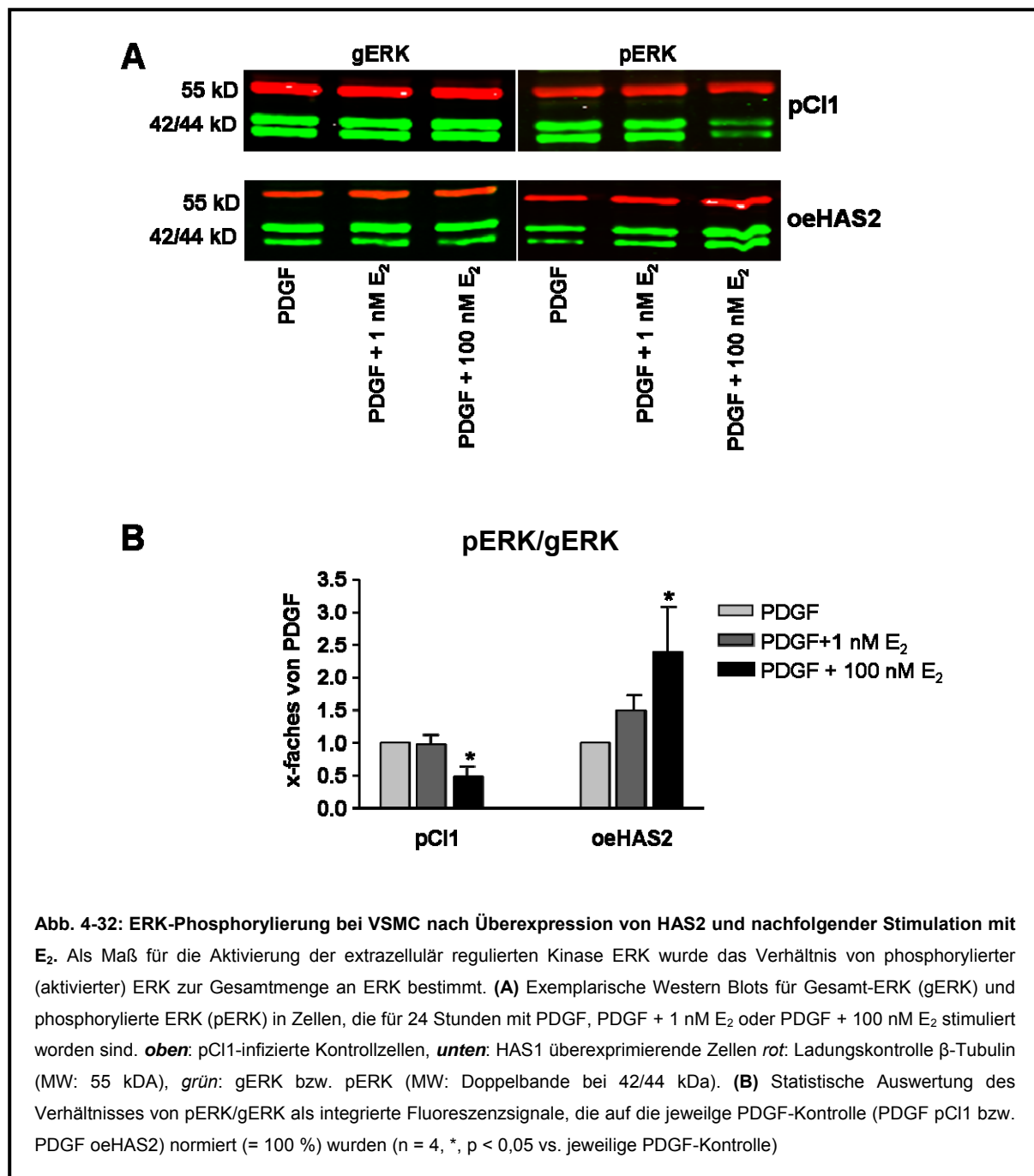
Die durch E₂ inhibierte PDGF-induzierte Proliferation konnte somit sowohl durch Überexpression von HAS1 als auch durch Überexpression von HAS2 aufgehoben werden.

4.2.8.2 Regulation der extrazellulär regulierten Kinase (ERK)

Es wurde untersucht, ob durch Überexpression von HAS1 bzw. HAS2 nicht nur der anti-proliferative E₂-Effekt kompensiert werden konnte, sondern ob sich gleichermaßen auch die durch E₂ vermittelte Reduktion der ERK-Phosphorylierung wieder aufheben ließ.



Wie in Abbildung 4-31 dargestellt, zeigte sich ein reduziertes pERK/gERK-Verhältnis in mit PDGF und E₂ stimulierten Zellen im Vergleich zu PDGF erwartungsgemäß auch in den mit pCI1 transduzierten Zellen (PDGF: 100 %, PDGF + 1 nM Estradiol: 98,4 % \pm 12,8 %, PDGF + 100 nM Estradiol: 70,9 % \pm 5,1 %). Durch Überexpression von HAS1 wurde die reduzierte ERK-Phosphorylierung in mit PDGF und E₂ stimulierten VSMC kompensiert (PDGF: 100 %, PDGF + 1 nM Estradiol: 71,6 % \pm 13,1 %, PDGF + 100 nM Estradiol: 122,0 % \pm 30,9 %).



Auch in den Experimenten, bei denen HAS2 in VSMC überexprimiert wurde, zeigte sich in den mit pCI1 transduzierten Zellen erwartungsgemäß ein reduziertes pERK/gERK-Verhältnis in mit PDGF und E₂ stimulierten Zellen im Vergleich zu mit PDGF stimulierten Zellen (PDGF: 100 %, PDGF + 1 nM Estradiol: 98,5 % \pm 12,2 %, PDGF + 100 nM Estradiol: 48,0 % \pm 16,0 %). Durch Überexpression von HAS2 wurde die reduzierte ERK-Phosphorylierung in mit PDGF und 100 nM E₂ stimulierten VSMC nicht nur auf Kontrollniveau erhöht, sondern sogar überkompensiert, so dass sich in den HAS2-überexprimierenden Zellen, die mit PDGF + 100 nM E₂ stimuliert

wurden, eine signifikant erhöhte ERK-Phosphorylierung im Vergleich zu mit PDGF stimulierten Zellen zeigte (PDGF: 100 %, PDGF + 1 nM Estradiol: 166,5 % \pm 25,0 %, PDGF + 100 nM Estradiol: 238,9 % \pm 69,2 %).

5. *Diskussion*

5.1 Tierversuche

5.1.1 Effekte von endogenen ovariellen Steroiden und exogen substituiertem Estradiol auf die Atherosklerose im Tiermodell

Die kombinierte Hormonersatztherapie mit Estrogenen und Gestagenen führte in der WHI-Studie zu einer erhöhten Inzidenz für Myokardinfarkt und Schlaganfall und auch im Estrogen-Arm der WHI-Studie konnten keine signifikant positiven Effekte einer Estradiol-Substitution gezeigt werden. Dies widerspricht dem Postulat der uneingeschränkt protektiven Wirkung von Estradiol auf das kardiovaskuläre System. Während der letzten Jahrzehnte führten Verbesserungen des Risikomanagements im Rahmen von Estrogen/Gestagen-Therapien in Hinblick auf die beiden Hauptindikationen „orale Kontrazeption“ und „Hormonersatztherapie“ Pharmakologen zur Anwendung der niedrigsten effektiven Dosis von Estrogenen in Kombination mit Gestagenen. Hohe Estrogen-Dosierungen, die die physiologischen Spiegel um ein Vielfaches übersteigen, ob alleine oder in Kombination sind obsolet und finden keine Anwendung mehr. Aber auch die Annahme, dass niedrige Estrogen-Dosierungen gegen koronare Herzerkrankungen schützen, ist durch große klinische Studien in Frage gestellt (Anderson *et al.*, 2004; Hulley *et al.*, 1998; Rossouw *et al.*, 2002). Als Konsequenz aus diesen klinischen Daten ist eine Langzeit-Hormonersatztherapie prinzipiell nicht mehr empfohlen.

Bislang an Mäusen beschriebene kardioprotektive Wirkungen von Estrogenen wurden unter Verwendung von hohen oder supraphysiologischen Estrogendosierungen durchgeführt. Im Licht der klinischen Ergebnisse und der daraus abgeleiteten Therapieempfehlungen sind die bestehenden Mausmodelle aber offensichtlich unzureichend. Die Etablierung eines Mausmodells, mit dem Effekte niedriger Estrogen-Dosierungen in Monosubstitution oder Ko-Substitution mit Gestagenen in Hinblick auf das kardiovaskuläre Risikoprofil „nachgestellt“ und analysiert werden können, ist aus wissenschaftlicher Sicht somit dringend notwendig. Die Etablierung eines solchen Modells wäre auch von großer gesundheitspolitischer Relevanz, weil hierdurch erstmalig ein Modell zur Verfügung stünde, an dem eventuell mechanistische Erklärungen für die unerwarteten Ergebnisse der WHI-Studie in Hinblick auf das Ausbleiben der Protektion einer Estrogen-Monosubstitution validiert werden könnten. Darüber hinaus würde ein solches Modell die Möglichkeit, eröffnen, Therapieschemata zu entwickeln, die kein ungünstiges kardiovaskuläres Risiko mehr implizieren würden. Vor diesem Hintergrund war es Ziel der

vorliegenden Arbeit ein Tiermodell zu etablieren, um die Mechanismen untersuchen zu können, die den atherogenen Eigenschaften exogen substituierten Estradiols plusminus Gestagen zu Grunde liegen.

Das in den beschriebenen Experimenten verwendete Protokoll basierte auf Untersuchungen von Bourassa *et al.* und war mit dem Ziel verbunden, die in diesen Experimenten erzielten Ergebnisse auf niedrigere Estradiol-Dosierungen auszuweiten und sich so am Therapieschema zu orientieren, das auch in der Humanmedizin Anwendung findet. Die gewählte Estradiolkonzentration orientierte sich an einer Studie von Elhage *et al.*, die maximale Estradioleffekte – einer jedoch nur 60 Tage währenden Substitution unter Fütterung einer normalen Diät – bei einer Dosierung zwischen 0,83 µg/d und 1,6 µg/d beobachteten (Elhage *et al.*, 1997). Gleichzeitig sollte die Analyse zusätzlicher Endpunkte, wie der Endothelfunktion und der Matrixkomposition, dazu dienen, erste mechanistische Einblicke in das Modell zu ermöglichen.

5.1.1.1 Atherosklerose nach Substitution von 6,6 µg E₂/Tag

Als Kontrolle wurden wie auch von Bourassa *et al.* beschrieben ApoE^{-/-}-Mäuse mit der supraphysiologischen Estradiol-Dosis von 6,6 µg pro Tag substituiert. Es zeigte sich wie erwartet ein massiv reduzierter Plaquebesatz der Aorta als Maß für eine stark reduzierte Atherosklerose in den Aorten von Tieren, die mit einer hohen Estradiol-Dosis substituiert wurden.

5.1.1.2 Substitution von 1,1 µg E₂/Tag

5.1.1.2.1 Bestimmung der Uterusgewichte und Estradiol-Plasmaspiegel

Um einordnen zu können, ob die in den beschriebenen tierexperimentellen Untersuchungen für die Substitution gewählte niedrige E₂-Dosis von 1,1 µg/Tag Effekte im physiologischen Bereich hatte, wurde versucht, die Plasma-Estradiol-Spiegel zu quantifizieren. Die Bestimmung der Plasma-Estradiol-Spiegel als direkter Parameter zur Validierung der Ovariectomie und der nachfolgenden Hormonsubstitution wurde mit dem “ultrasensitive radioactive immunoassay (RIA) DSL-4800“ von Beckman Coulter GmbH (Sinsheim, Germany) und dem „enzyme immunoassay (EIA)“ von American Research Products, Inc.TM durchgeführt. In

beiden Fällen lag die Extinktion der Proben jedoch meist im Bereich der Extinktion des Puffers oder sogar darunter, so dass die E₂-Plasma-Konzentrationen nicht bestimmt werden konnten. Eine mögliche Ursache für das Fehlschlagen der Bestimmung der Plasma-Estradiol-Spiegel liegt darin, dass die Fütterung von ApoE^{-/-}-Mäusen mit einer fettreichen Diät (Western-Diät) zur Ausprägung von Hypercholesterinämie und Hypertriglyzeridämie führt. Durch die hohen Lipid-Konzentrationen kann es zu einem ausgeprägten „Löschen“ des Estradiol-Signals kommen. Um die physiologischen Effekte einer Hormondepletion bzw. -substitution dennoch nachvollziehen zu können, wurden als indirekter, physiologischer Parameter die Uterusgewichte bestimmt. Bourassa *et al.* konnten zeigen, dass es durch Ovariectomie zu einer Uterusatrophie kommt und die uterotropen Wirkungen exogen substituierten Estradiols zu einer Uterushypertrophie führen (Bourassa *et al.*, 1996). Dies steht auch in Einklang mit Arbeiten von Kalu *et al.*, Westerlind *et al.* und Bauss *et al.*, die feststellten, dass sich das „Uterusfeuchtgewicht“ in ovariectomierten Ratten unter Estrogensubstitution in der Größenordnung der Kontrolltiere wiederfand (Bauss *et al.*, 1996; Kalu *et al.*, 1991; Westerlind *et al.*, 1993). Auch in unseren Versuchsgruppen zeigte sich nach Ovariectomie eine massive Uterusatrophie. Durch exogene Estradiol-Substitution wurde eine Uterushypertrophie induziert, deren Ausprägung sich im Bereich der Uterusgewichte nicht ovariectomierter Kontrolltiere bewegte. Dieses Ergebnis zeigte zum einen, dass die Ablation der endogenen Sexualhormonsynthese durch Ovariectomie den erwarteten physiologischen Effekt hatte, zum anderen aber auch, dass die für die Substitution gewählte Estradiol-Dosis zu Estradiol-Spiegeln führte, die sich im Bereich physiologischer Konzentrationen bewegten.

5.1.1.2.2 Bestimmung der Körpergewichte und des Lipidprofils

Als Surrogatparameter für die Ablation der Estrogenwirkungen und der effizienten Hormonsubstitution diente auch die Bestimmung des Körpergewichts der Mäuse. Ein gewichtsreduzierender Effekt von Estradiol konnte bereits in nicht transgenen Wildtypmäusen gezeigt werden, die mit einer fettreichen Diät gefüttert wurden und in der entsprechenden Studie als Mausmodell für Fettleibigkeit dienten: Bryzgalova *et al.* konnten zeigen, dass das Gewicht weiblicher Wildtypmäuse, die ab einem Alter von 8 Wochen für einen Zeitraum von 10 Monaten mit einer fettreichen Diät gefüttert wurden, durch Gabe von Estradiol während der letzten Monate der Fütterung,

gesenkt wurde. Konsistent mit diesen Ergebnissen hatte auch in unseren Experimenten die Ovariectomie eine massive Gewichtszunahme zur Folge, die im Vergleich zu plazebosubstituierten Tieren nach exogener Estradiol-Substitution wieder auf Kontrollniveau reduziert war. In Untersuchungen von Bryzgalova *et al.* konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Estradiol-Substitution die Expression der Gene, die für Resistin und Leptin kodieren, im weißen Fettgewebe senkte, während die Adiponektin-Expression unverändert blieb. Darüber hinaus waren in den Experimenten die Expressionsspiegel des Proteins SREBP1c und seiner lipogenen Zielgene, wie Fettsäure-Synthase und Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1), im weißen Fettgewebe reduziert. Auch in der Leber war die Expression von SCD1 reduziert (Bryzgalova *et al.*, 2008). Möglicherweise könnte der gewichtsreduzierende Effekt des Estradiols in unseren Versuchen somit u.a. auch auf eine reduzierte Expression von lipogenen Genen in weißem Fettgewebe und Leber zurückzuführen sein. Cederroth *et al.* zeigten, dass auch eine phytoestrogenreiche Diät Adipositas in Mäusen senkt und so das Körpergewicht reduziert (Cederroth *et al.*, 2008). An Ratten konnte außerdem beobachtet werden, dass eine Ovariectomie eine vermehrte Futteraufnahme und einen erniedrigten Energieverbrauch bedingte und somit zur Verfettung der Tiere führte. Dies stand offenbar in Zusammenhang mit dem massiven Abfall der Estradiol-Serumkonzentration (Danielsen *et al.*, 1993). Neben einer veränderten Genexpression kann als mögliche Erklärung für die durch OVX induzierte Gewichtszunahme in unseren Experimenten daher auch eine vermehrte Futteraufnahme in Kombination mit einem erniedrigten Energieverbrauch diskutiert werden.

5.1.1.2.3 Atherosklerose

Die Versuche zur Evaluation des atherogenen Potentials endogenen sowie nach Ovariectomie in niedrigen Dosierungen substituierten Estradiols (1,1 µg/Tag) zeigten zunächst, dass das Ausmaß der Atherosklerose in Mäusen nach Ovariectomie reduziert war. Das lässt den Schluss zu, dass endogene, ovarielle Steroide die Progression der Atherosklerose unter den gewählten Bedingungen beschleunigen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Estradiol die antiatherogenen Effekte einer Ovariectomie antagonisiert, wenn es ovariectomierten ApoE^{-/-}-Mäusen unter Fütterung einer Western-Diät über einen Zeitraum von 90 Tagen subkutan in physiologischen Dosierungen substituiert wird. Der Anstieg der Atherosklerose in

Antwort auf 1,1 µg Estradiol pro Tag in unserer Untersuchung steht im Kontrast zu früheren Experimenten, die zeigten, dass höhere Dosen Estradiol (3 µg bis 28 µg pro Tag) die Atherosklerose in ApoE^{-/-}-Mäusen auf Western Diät inhibieren (Bourassa *et al.*, 1996; Elhage *et al.*, 1998).

Die in den Experimenten validierten proatherogenen Eigenschaften von Estradiol, konnten nur nach Estrogen-Substitution in niedrigen Dosierungen (1,1 µg/Tag) gezeigt werden, während eine Substitution supraphysiologischer Dosierungen (6,6 µg/Tag) antiatherosklerotische Effekte zeigte. Für einen wichtigen Einfluss der Estradiol-Plasmakonzentrationen sprechen auch Beobachtungen von Jarrar *et al.* (Jarrar *et al.*, 2000b), die zeigen, dass weibliche Ratten im Proestrus 24 Stunden nach Trauma-Hämorrhagie normalisierte Organfunktionen haben, während weibliche Ratten im Estrus eine ausgeprägte Depression kardiovaskulärer und hepatozellulärer Funktionen zeigen. Die Erhaltung kardialer und hepatischer Funktionen nach einem schwerwiegenden Blutverlust ist mit hohen Spiegeln von 17-β-Estradiol assoziiert. Unterstützend ist Jarrars Beobachtung, dass weibliche Ratten im Proestrus verglichen mit Männchen nach Wiederbelebung in einem Trauma-Hämorrhagie-Modell verbesserte kardiale Funktionen hatten. Diese Effekte wurden nicht während anderer Phasen des Zyklus` beobachtet, in denen die Estrogen-Spiegel niedriger waren (Jarrar *et al.*, 2000a). Die Diskrepanz in der Protektion zwischen niedrigen und hohen Estrogen-Dosen in unserer Studie kann, wie in Jarrars Studie, in den unterschiedlichen Effekten niedriger und supraphysiologischer Dosierungen auf das kardiovaskuläre System begründet liegen.

Unsere Ergebnisse eröffnen erstmalig die Perspektive, die in der Humantherapie beschriebenen atherothrombotischen Effekte einer Estradiolsubstitution nun auch im Tiermodell hinsichtlich proatherosklerotischer Effekte nachzustellen, mechanistisch aufzuklären und die so gewonnen Erkenntnisse langfristig eventuell in klinische Empfehlungen umsetzen zu können.

5.1.1.2.4 Endothelfunktion

Erste Untersuchungen zur Erklärung der den proatherogenen Estradiolwirkungen zugrunde liegenden Mechanismen zeigten, dass die endothelabhängige Relaxation in ApoE^{-/-}-Mäusen nach Ovariectomie verbessert und nach Behandlung mit Estradiol wieder verschlechtert war. Das legt eine kausale Rolle von Estradiol nahe. Die Effekte der Ovariectomie und der nachfolgenden Hormonsubstitution auf die

Endothelfunktion könnten von Bedeutung sein, weil angenommen wird, dass eine verschlechterte Endothelfunktion der Entwicklung der Atherosklerose beim Menschen (Ross, 1993) und in geringerem Maß auch bei der Maus (d'Uscio *et al.*, 2001; Wassmann *et al.*, 2004) vorausgeht. Die verschlechterte Endothelfunktion ist also konsistent mit den Daten, die zur Atherosklerose erhoben wurden, auch wenn in der Literatur bereits endothelprotektive Effekte von Estradiol in Femoralarterien und der *arteria carotis* bei Mäusen beschrieben wurden (Guo *et al.*, 2005). Die Endothelspezifität der beobachteten Effekte konnte ebenfalls verifiziert werden, da thorakale Aortenringe ovariectomierter Mäuse sogar einen Trend hin zu verschlechterter Ansprechbarkeit auf die vasorelaxierenden Wirkungen des exogenen NO-Donors SNAP zeigten bzw. Kontrolltiere eine verbesserte Relaxation nach SNAP-Gabe zeigten, obwohl die Ansprechbarkeit auf ACh verschlechtert war. Die verbesserte Relaxation von Aortenringen aus nicht ovariectomierten Kontrolltieren – in Antwort auf SNAP – einhergehend mit einer verschlechterten Endothelfunktion, ist ein Phänomen, das aus Experimenten mit eNOS-knockout-Mäusen bekannt ist. Diese Mäuse zeigen eine Hypersensitivität für Nitro-Vasodilatoren (Kojda *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass eine (Zer-)Störung des Endothels zu einer Aufregulation der löslichen Guanylatzyklase (sGC) und einer Supersensitivität für Nitroprussid-Natrium (Shirasaki *et al.*, 1985) führt. Estrogen stimuliert akut (schnell) die Vasodilatation über nicht-genomische Wege und steigert die eNOS-Aktivierung (Chen *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu konnte in unseren Experimenten eine reduzierte endothelabhängige Relaxation in Antwort auf chronische Estradiol-Substitution gezeigt werden. Auch Darblade *et al.* konnten eine verschlechterte durch ACh induzierte, endothelabhängige Vasodilatation nur nach Langzeitbehandlung mit Estradiol und nicht nach kurzzeitiger *in vitro*-Applikation nachweisen. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass erst eine chronische Behandlung und genomische Effekte in einer verschlechterten durch ACh induzierten, endothelabhängigen Relaxation münden (Darblade *et al.*, 2002). Dennoch ist es nicht auszuschließen, dass bei Estradiol-Dosen ähnlich den in der beschriebenen Untersuchung verwendeten (0,05 µg/g Körpergewicht) (Kazi *et al.*, 2007) auch nicht-genomische Effekte auftreten.

In diesem Kontext zeigen einige Experimente, dass Estradiol die NFκB-Aktivität beeinflussen kann (Hamilton *et al.*, 2004; Stice *et al.*, 2008). Frühe Effekte implizieren eine schnelle, nicht-genomische Aktivierung von NFκB, die protektiv sind

und in späteren Phasen mit genomischen Effekten zusammen auftreten können. Die nicht-genomische Estradiol-Signaltransduktion aktiviert NFκB und die Hitzeschock-Antwort und erhöht die zelluläre Resistenz gegenüber Verletzung. Hitzeschock-Protein-Expression aber führt zur Inhibition von Apoptose und Entzündung und supprimiert die NFκB-Aktivierung. Das negative „*feedback*“ durch die Hitzeschock-Antwort beeinflusst wiederum die schädlichen Effekte, die mit einer chronischen NFκB-Aktivierung verbunden sind (Stice *et al.*, 2008). Aufgrund der Komplexität der Interaktion zwischen Estradiol, NFκB und der Hitzeschock-Antwort und dem Mangel an mechanistischen Untersuchungen hinsichtlich dieser Interaktionen kann aber allenfalls spekuliert werden, dass sich der vorstehend erwähnte Unterschied in der Atheroprotektion bei verschiedenen Estrogen-Dosierungen auch auf Ebene von NFκB und/oder der Hitzeschock-Antwort im Kontext der *Ausprägung* nicht-genomischer Estradiol-Effekte ereignen könnte.

Neben der Dosisabhängigkeit der beobachteten Effekte kann es auch von Bedeutung sein, dass die Estradiolsubstitution mit einem zeitlichen Abstand von zwei Wochen zur Ovariectomie, also nach experimenteller Menopause, initiiert wurde. Darüber hinaus wurden die Tiere mit einer fett- und cholesterinreichen Diät gefüttert. Diese experimentellen Bedingungen spiegeln teilweise die Charakteristika wieder, auf denen die einleitend beschriebene Zeithypothese beruht, dass nämlich negative Effekte einer HRT in älteren Frauen wahrscheinlich darin begründet liegen, dass das Zeitfenster, innerhalb dessen Estrogene atheroprotektive Effekte gehabt haben könnten, verfehlt wurde. Die Ergebnisse der bereits zitierten klinischen Studien zeigten dementsprechend, dass postmenopausale Frauen mit vorbestehender Atherosklerose und einem hohen kardiovaskulären Risiko auch ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse nach Hormonersatztherapie hatten.

5.1.1.2.5 Plaquemorphologie

Zusätzlich zum Ausmaß der Atherosklerose und der Endothelfunktion wurden die Effekte einer Ovariectomie und einer nachfolgenden Hormonsubstitution auf die Zusammensetzung von Plaques untersucht, weil die Komposition und die Umsetzung der extrazellulären Matrix innerhalb der Gefäßwand und der atherosklerotischen Plaques zum Risiko der Plaque-Progression, -Ruptur, -Erosion und daraus folgend von Stenosen und thromboembolischen Komplikationen beitragen (Kolodgie *et al.*, 2002; Newby *et al.*, 1999; Plutzky, 1999).

5.1.1.2.5.1 Lipidgehalt atherosklerotischer Plaques des Aortenursprungs

Hinsichtlich des Lipidgehalts atherosklerotischer Plaques konnte nur nach Ovariectomie eine verstärkte Akkumulation von Lipiden in den Plaques des Aortenursprungs gezeigt werden, die aber durch Estradiol-Substitution nicht wieder auf Kontrollniveau gesenkt wurde. Das führte zu der Annahme, dass der durch OVX induzierte Effekt keiner war, der allein durch die Depletion endogenen, ovariellen Estradiols induziert wurde, sondern in Zusammenhang mit weiteren ovariellen Steroiden stehen muss.

5.1.1.2.5.2 Kollagengehalt und -packungsdichte, Makrophagen-Retention und Hyaluronsäure-Akkumulation

Eine wichtige strukturelle Komponente der extrazellulären Matrix ist Kollagen. Das Kollagen-Molekül besteht aus drei Pro-Kollagen-Ketten, die in einer Dreifach-Helix assembliert sind. Es gibt mindestens 19 verschiedene Typen von Kollagen in der Gefäßwand, von denen die TypI- und TypIII-Kollagen-Fibrillen prädominant und dafür verantwortlich sind, Zugstabilität und Elastizität zu verleihen (Plenz *et al.*, 2003). In normalen, nicht atherosklerotischen Gefäßen sind SMCs in der Media lokalisiert und erfüllen eine kontraktile Aufgabe, während sie in atherosklerotischen Plaques für die Kollagensynthese verantwortlich sind. In den Läsionen wandern SMCs von der Media in die Intima und bedingen dort so auch einen erhöhten Kollagengehalt (Newby *et al.*, 1999). Parallel dazu sezernieren inflammatorische Zellen wie Makrophagen Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die eine Proteolyse des Matrix-Kollagens induzieren. Diese dynamische Dysbalance zwischen Kollagensynthese und -degradation bestimmt den Kollagen-Gehalt in der fibrotischen Kappe (Newby *et al.*, 1999). In unseren Experimenten war der Gesamt-Kollagen-Gehalt in den atherosklerotischen Plaques nach Estradiolsubstitution zwar signifikant reduziert, es zeigten sich aber keine Unterschiede zwischen Kontrollen und ovariectomierten ApoE^{-/-}-Mäusen. Die Analyse der Kollagenfibrillendichte hingegen offenbarte, dass es nach Ovariectomie einen Trend hin zu erhöhter Kollagenfibrillendichte gab, der durch Estradiol wieder auf das Niveau von Kontrolltieren reduziert wurde und Hinweis auf eine estradiolabhängige Regulation der Kollagenfibrillendichte in atherosklerotischen Läsionen ist.

Die Retention von Makrophagen war in keiner der Gruppen voneinander verschieden und weder nach Ovariectomie noch nach Estrogen-Monosubstitution konnten Effekte

auf den Gehalt an Hyaluronsäure in den atherosklerotischen Läsionen gezeigt werden.

5.1.1.2.5.3 Gehalt α -SM-Aktin positiver Zellen

Hinsichtlich einer zellulären Umstrukturierung der Läsionen nach Ovariectomie bzw. Estradiolsubstitution, konnte gezeigt werden, dass die Ovariectomie den Gehalt an α -SM-Aktin positiven Zellen in Plaques des Aortenursprungs erhöhte und Estradiol die α -SM-Aktin Akkumulation wieder partiell reduzierte. Dies kann auf einen verringerten SMC-Gehalt hindeuten oder durch eine reduzierte Differenzierung von SMCs bedingt sein (Yoshida *et al.*, 2007) und ist konsistent mit der beschriebenen durch ER α beeinflussten Inhibition der Differenzierung humaner, aortaler, glatter Gefäßmuskelzellen *in vitro* (Montague *et al.*, 2006).

Zelluläres und strukturelles *Remodelling*, insbesondere ein reduzierter Gehalt α -SM-Aktin positiver Zellen sowie ein reduzierter Gesamtkollagengehalt können in eine veränderte thrombotische Antwort involviert sein.

5.1.1.2.6 Evaluation der Thrombusbildung

Die Evaluation des thrombotischen Potentials nach Ovariectomie und sich anschließender Hormonsubstitution mit E₂ erfolgte im Modell der laserbasierten photochemisch induzierten Thrombose. Dieses Modell wurde gewählt, weil es als das *in vivo* Thrombosemodell angesehen wird, das am sensitivsten ist und selbst geringfügige Unterschiede in der thrombotischen Antwort mit höchster Akkuratheit (Westrick *et al.*, 2007) detektiert. In diesem Modell wird dem Endothel – durch photochemische Aktivierung des Farbstoffs Rose Bengal – ein oxidativer Schaden zugefügt, der dazu führt, dass Plättchen an die subendotheliale Matrix adhären und die Koagulationskaskade initiieren können (Westrick *et al.*, 2007). Weder die Ovariectomie noch die Estradiol-Monosubstitution in physiologischen Dosierungen beeinflussten aber die Thrombus-Bildung in dem gewählten Modell.

Diese Ergebnisse zeigen, dass endogene, ovarielle Steroide und in niedrigen Dosierungen substituiertes E₂ keinen Einfluss auf die thrombotische Antwort in diesem Mausmodell haben, interessanterweise aber pro-atherosklerotische Effekte vermitteln. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass endogene, ovarielle Steroide

und in niedrigen Dosierungen substituiertes E₂ in strukturelles und zelluläres *Remodelling* atherosklerotischer Plaques *in vivo* involviert sind.

Erstmalig konnten somit auch in tierexperimentellen Untersuchungen pro-atherosklerotische E₂-Effekte dargestellt werden, die mit den Daten aus klinischen Studien korrelieren, in denen keine positiven Effekte von E₂ auf das Herzkreislauf-System gezeigt werden konnten. Dieses Mausmodell scheint somit geeignet, in der Humantherapie beobachtete aber bislang nicht erklärbare negative Effekte einer Hormonsubstitution auf das kardiovaskuläre System tierexperimentell nachvollziehen und analysieren zu können.

In Anlehnung an die in der WHI-Studie beschriebene, mit einer kombinierten Hormonersatztherapie verbundene, erhöhte Inzidenz thromboembolischer Komplikationen in postmenopausalen Frauen, wurde das etablierte Mausmodell im Folgenden verwendet, um auch die Effekte der kombinierten Hormonersatztherapie mit E₂ und MPA hinsichtlich ihrer Effekte auf den Symptomenkomplex der Atherothrombose zu untersuchen.

5.1.2 Effekte von Estrogen/Gestagen-Kombinationen auf die Atherothrombose im Tiermodell

5.1.2.1 Bestimmung der Uterusgewichte

Um auch die Effektivität der MPA-Substitution zu validieren, wurden – wie schon für die Estradiolsubstitution beschrieben – die Uterusgewichte bestimmt. MPA alleine hatte keinen Effekt auf das Uterusgewicht, konnte aber die uterotropen Estradiol-Effekte signifikant antagonisieren. Bei der humanen Hormonersatztherapie wird MPA unter anderem substituiert, um die Risiken einer Endometriumshyperplasie (Gelfand *et al.*, 1989; Paterson *et al.*, 1980; Whitehead *et al.*, 1979; Woodruff *et al.*, 1994) und von Endometriumkarzinomen (Beresford *et al.*, 1997; Hammond *et al.*, 1979; Persson *et al.*, 1989; Pike *et al.*, 1997; Voigt *et al.*, 1991) zu senken. In diesem Zusammenhang bestätigte die durch MPA vermittelte Inhibition der durch Estradiol induzierten Uterushypertrophie, dass die Substitution mit den gewählten MPA-Dosierungen die in der Humantherapie intentionierten Effekte auch im Mausmodell zeigte. Die von uns gewählte MPA-Dosis basierte auf früheren Studien von Hanke *et al.* und Shultz *et al.*, die Gestagen-Dosierungen verwendeten, welche zu einem Gestagen/Estrogen Verhältnis zwischen 10:1 und 100:1 führten (Hanke *et al.*, 1996; Shultz *et al.*, 2004).

5.1.2.2 Bestimmung der Körpergewichte und des Lipidprofils

Wie schon für die Estrogenmonosubstitution beschrieben, hat Estrogen einen gewichtsreduzierenden Effekt, der auch in der Gruppe der mit E₂ und MPA substituierten Tiere manifest wurde. Das Gewicht der alleine mit MPA substituierten Tiere war von dem Gewicht der mit Plazebo substituierten Tiere nicht verschieden. Hinsichtlich der Gesamtcholesterol- und Triglyzeridspiegel gab es in keiner der Gruppen signifikante Unterschiede.

5.1.2.3 Evaluation der Thrombusbildung

Die Evaluation des thrombotischen Potentials nach Hormonsubstitution mit E₂ und MPA erfolgte wie schon für Estradiol im Modell der laserbasierten photochemisch induzierten Thrombose. Eine kombinierte Substitution von MPA und Estradiol zeigte stark prothrombotische Effekte, die auch nach MPA-Monosubstitution nachweisbar waren. Die in dem gewählten Atherosklerose-Mausmodell unter Fütterung einer hochkalorischen Diät nach Langzeitapplikation (90 Tage) validierten prothrombotischen Effekte sind möglicherweise das experimentelle Korrelat der in der WHI-Studie beschriebenen negativen Wirkungen einer kombinierten Hormonersatztherapie beim Menschen. Darüber hinaus war die Häufigkeit der Rekonstituierung des Blutflusses in den mit MPA und einer Kombination aus MPA und Estradiol behandelten Tieren im Vergleich zu mit Plazebo behandelten Tieren signifikant reduziert. Mögliche Erklärungen hierfür könnten sein, dass entweder das Plättchen-Aggregat selbst stabiler oder die Adhäsion des Plättchen-Thrombus an die Gefäßwand der *arteria carotis communis* in den MPA oder MPA/Estradiol substituierten Tieren stärker war. Ein potentieller Mechanismus, der diesem möglicherweise veränderten Plättchencharakter zugrunde liegen könnte, könnte eine verstärkte Aktivierung von Plättchen sein.

5.1.2.4 Evaluation der Plättchenaktivierung und Thrombinbildung

5.1.2.4.1 Basale und induzierte P-Selektin (CD62P)-Expression auf Plättchen

Mechanistische Experimente zeigten jedoch, dass die basale P-Selektin-Expression als Marker für die Plättchen-Aktivierung durch keine der Hormon-Substitutionen beeinflusst wurde und dass auch die durch Convulxin induzierte P-Selektin-Expression, weder in mit MPA noch in mit MPA/Estradiol behandelten Tieren erhöht

war. Convulxin ist ein heterodimeres C-Typ Lektin, das aus dem Gift der Klapperschlange isoliert wird. Es aktiviert Plättchen über Bindung und Clusterung des Glykoproteins VI auf der Oberfläche der Plättchen. Es zeigte sich sogar, dass in der kombiniert substituierten Gruppe eine – im Vergleich zu plazebobehandelten Tieren – reduzierte Plättchen-Aktivierung nach Convulxin-Stimulation resultierte.

Eine erhöhte basale Plättchen-Aktivierung oder eine verstärkte Aktivierbarkeit der Plättchen durch die Hormonsubstitution kann als dem prothrombotischen Status zugrunde liegender Mechanismus somit ausgeschlossen werden. Diese Resultate sind konsistent mit dem Befund, dass die Plättchenfunktion bei postmenopausalen Frauen mit koronarer Herzerkrankung nicht beeinträchtigt ist und dass die *ex vivo* Plättchen-Aggregation in Antwort auf ADP sowohl durch Estrogen als auch durch MPA sogar inhibiert wird (Bar *et al.*, 2000).

5.1.2.4.2 Endogenes Thrombinpotential in plättchenarmem Plasma

Neben den Effekten auf die Plättchen können prothrombotische Phänotypen auch durch Veränderungen in der Gerinnungskaskade oder ein Gefäß(wand)-*Remodelling* induziert werden. Interessanterweise war das endogene Thrombinpotential (ETP) als Parameter für das Ausmaß der Thrombingenerierung in Antwort auf MPA erhöht, während die kombinierte Gabe von MPA und Estradiol keinen Effekt auf das ETP hatte. Gesteigerte Thrombin-Aktivität auf Plättchen und Fibrinogen in Antwort auf MPA könnte deshalb sowohl zur akzellierten Thrombus-Entstehung als auch zur erhöhten Thrombusstabilität beitragen. Diese Ergebnisse reihen sich in klinische Daten ein, die zeigen, dass Estrogene und Gestagene antikoagulatorische Faktoren, wie Antithrombin III und Protein C, reduzieren (Hoibraaten *et al.*, 2000; Scarabin *et al.*, 1997; Sumino *et al.*, 2005) und zugleich hämostatische Faktoren erhöhen (Scarabin *et al.*, 1997). Die Tatsache, dass eine kombinierte Substitution mit MPA und Estradiol das endogene Thrombinpotential nicht beeinflusste, lässt den Schluss zu, dass Estradiol die Effekte von MPA auf das ETP antagonisiert. Gleichzeitig bedeutet dieser Befund, dass es weitere Mechanismen geben muss, die auch den prothrombotischen Effekt in der Gruppe der kombiniert substituierten Tiere erklären. Bei der Suche nach Mechanismen, die das erhöhte thrombotische Potential in den kombiniert behandelten Tieren erklären könnten und eventuell dem prothrombotischen MPA-Effekt außerdem zugrunde liegen könnten, wurde das Ausmaß

der Atherosklerose von mit Plazebo, MPA und MPA/E₂ substituierten Tieren bestimmt.

5.1.2.5 Ausmaß der Atherosklerose

Die Ergebnisse zeigen, dass MPA das Ausmaß der Atherosklerose im ApoE^{-/-}-Mausmodell unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht erhöht, sondern sogar um ca. 20 % reduziert, während die mit Estradiol kombinierte Gabe keinen Effekt auf den Plaquebesatz in der Aorta hat. Da sich der Plaquebesatz in der Aorta kombiniert substituierter Tiere nicht von dem Plaquebesatz plazebobehandelter Tiere unterschied, kann auch die Atherosklerose den prothrombotischen Phänotyp der kombiniert behandelten Tiere nicht erklären. Ein *verstärktes* Maß an Atherosklerose als weiterer, dem pro-thrombotischen MPA-Effekt zugrunde liegender Mechanismus kann ebenfalls ausgeschlossen werden.

Dennoch ist der antiatherosklerotische Effekt von MPA ein interessanter Befund: Ein potentieller Mechanismus dieses Effekts von MPA könnte sein, dass MPA nicht nur Progesteronrezeptoren aktiviert, sondern auch eine partial-agonistische Wirkung auf Androgen- und Glukokortikoidrezeptoren hat (Poulin *et al.*, 1989; Poulin *et al.*, 1991). Für die androgene Partialwirkung des MPA wurde postuliert, dass sie anti-inflammatorische Wirkungen während der Atherosklerose in postmenopausalen Frauen bedingt (Wakatsuki *et al.*, 2002). Koubovec *et al.* zeigten außerdem, dass MPA die Zytokinexpression in Mausfibroblasten reduziert und anti-inflammatorische Effekte über den Glukokortikoidrezeptor vermittelt (Koubovec *et al.*, 2004). Der in den beschriebenen Versuchen beobachtete antiatherosklerotische Effekt des MPA könnte also sowohl in seinem androgenen Charakter als auch in seiner glukokortikoiden Partialwirkung begründet liegen. Eine weitere mögliche Ursache könnte eventuell eine verbesserte Endothelfunktion sein. Gleichzeitig ist es denkbar, dass eine verschlechterte Endothelfunktion, also ein vermindertes Maß an Vasoreaktivität, dem prothrombotischen Phänotyp der *kombiniert* substituierten Tiere zugrunde liegen könnte.

5.1.2.6 Endothelfunktion

Eine endotheliale Dysfunktion wird als der erste Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose erachtet (Crauwels *et al.*, 2003). Es gibt aber auch Publikationen, die zeigen, dass keine Korrelation zwischen dem Ausmaß an Atherosklerose und den

EC₅₀- und R_{max}-Werten der ACh-induzierten Vasorelaxation besteht (Jiang *et al.*, 2001). In den beschriebenen Experimenten zeigte sich aber zwischen den Gruppen der mit Placebo bzw. MPA oder MPA + E₂ behandelten Tiere keine Beeinträchtigung der endothelabhängigen Relaxation in Antwort auf ACh. Demnach kann eine verschlechterte Ansprechbarkeit auf Acetylcholin als Mechanismus, der dem prothrombotischen Effekt der kombinierten Substitution zugrunde liegt, ausgeschlossen werden. Die Vasorelaxation in Antwort auf SNAP nach MPA-Behandlung war darüber hinaus sogar signifikant verschlechtert.

Durch Transnitrosierungsreaktionen entstehen aus SNAP spontan zerfallende S-Nitrosothiole. Die dadurch bedingte Freisetzung von NO geschieht nicht enzymatisch und führt zur Freisetzung von NO in den extrazellulären Raum. Die verminderte Ansprechbarkeit von mit MPA behandelten Tiere auf SNAP könnte so durch eine erhöhte Degradation von exogen gebildetem NO, z.B. durch Oxidation, bedingt sein (d'Uscio *et al.*, 2001).

5.1.2.7 Plaquemorphologie

5.1.2.7.1 Lipidgehalt atherosklerotischer Plaques des Aortenursprungs

Ein weiterer Faktor, der das thrombotische Potential beeinflussen kann, ist der zelluläre und strukturelle Umbau von Gefäßen und Plaques. Wie einleitend beschrieben, ereignen sich Plaque-Rupturen, die mit Myokardinfarkt assoziiert sind, häufig in den Schulterregionen von Plaques und treten eher in Läsionen mit ausgedünnter fibrotischer Kappe, relativ hohen Konzentrationen lipidbeladener Makrophagen und großem nekrotischen Kern auf (Glass *et al.*, 2001). Felton *et al.* berichteten, dass freies Cholesterol im nekrotischen Kern mit einer Instabilität der entsprechenden Läsionen assoziiert ist und der Übergang zu einer instabilen Läsion immer mit einer Anhäufung freien und veresterten Cholesterols einhergeht (Felton *et al.*, 1997). Der Einfluss der Lipid-Komposition auf die Plaque-Stabilität beim plötzlichen Herztod wird auch in einer Studie von Virmani *et al.* belegt, in der der prozentuale Anteil an Cholesterol-Lücken in Läsionen mit Rupturen größer ist als in erodierten oder stabilen Plaques (Virmani *et al.*, 2000). Bezüglich des Lipidgehaltes in den Plaques der experimentellen Gruppen konnte aber nur in den mit MPA monosubstituierten Tieren eine Tendenz hin zu gesteigerter Lipidakkumulation gezeigt werden. Signifikante Unterschiede traten aber im Vergleich der Gruppen untereinander bei keiner Behandlung auf.

5.1.2.7.2 SMC-Gehalt, Makrophagen-Retention und Hyaluronsäure-Akkumulation

Neben der Akkumulation von Lipiden spielen aber vor allen Dingen auch zelluläre Veränderungen, wie die Invasion glatter Muskelzellen und die Retention von Makrophagen sowie eine strukturelle Reorganisation der Matrix eine wichtige Rolle in der Initiation und Progression von Atherosklerose und Atherothrombose. MPA und Estradiol senkten in den beschriebenen Experimenten die Akkumulation α -Aktin-positiver Zellen in Plaques des Aortenursprungs. Dies deutet entweder auf einen reduzierten Gehalt an glatten Muskelzellen und/oder auf eine verminderte Differenzierung der glatten Muskelzellen hin (Yoshida *et al.*, 2007). Diese Effekte auf glatte Muskelzellen könnten von Bedeutung sein, weil eine reduzierte Akkumulation glatter Muskelzellen immer mit einer Schwächung der fibrotischen Kappe assoziiert werden muss und dedifferenzierte glatte Muskelzellen synthetisch aktiver sind und so eventuell eine luminale Verengung unterstützen könnten. Die Retention von Makrophagen hingegen war in keiner der Gruppen beeinflusst. Hinsichtlich eines möglichen *Remodellings* der EZM, war interessanterweise der Gehalt an Hyaluronsäure in Antwort auf die kombinierte Substitution mit MPA und Estradiol erhöht: Hyaluronsäure ist eine Kohlenhydratkomponente der extrazellulären Matrix, die sowohl die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen unterstützt (Evanko *et al.*, 1999) als auch zur Ausdehnung der intimalen, extrazellulären Matrix beiträgt. So stellt sie wahrscheinlich einen Promotor der luminalen Verengung im Verlauf der Atherosklerose dar (Toole *et al.*, 2002). Zusätzlich wird Hyaluronsäure als Matrixbestandteil mit prothrombogenen Eigenschaften diskutiert, weil eine dramatische Akkumulation von Hyaluronsäure an der luminalen Oberfläche humaner, erodierter Plaques gezeigt werden konnte (Kolodgie *et al.*, 2002). Dies deutet darauf hin, dass ein erhöhter Hyaluronsäure-Gehalt in atherosklerotischen Plaques in eine akzellerierte, thrombotische Antwort involviert sein könnte, insbesondere nach kombinierter Hormonsubstitution mit MPA und Estradiol. Der Anstieg des Gehalts an Hyaluronsäure und die Reduktion des Gehalts α -SM-Aktin positiver Zellen war nur in den Plaques der kombiniert substituierten Tiere signifikant. Das legt nahe, dass MPA und Estradiol additive Effekte auf diese Parameter haben. Gleichzeitig könnte dieses zelluläre und strukturelle *Remodelling* der Plaques eine mögliche Erklärung für den beobachteten prothrombotischen Phänotyp nach kombinierter Hormonsubstitution sein.

Zusätzlich zu dem erhöhten endogenen Thrombinpotential und der erhöhten Menge an Hyaluronsäure bzw. der reduzierten Anzahl α -SM-Aktin positiver Zellen können aber auch andere Mechanismen zum prothrombotischen Effekt von MPA und der Kombination von MPA und Estradiol beitragen. Eine veränderte Genexpression in der Gefäßwand kann zum Beispiel ebenfalls mechanistische Erklärungen liefern. Herkert *et al.* haben nach MPA-Behandlung eine erhöhte Expression von Thrombinrezeptoren auf vaskulären, glatten Muskelzellen beschrieben (Herkert *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnten eine Herabregulation der endothelialen NO-Synthase in Endothelzellen (Zerr-Fouineau *et al.*, 2007) oder eine Aufregulation der NADPH-Oxidase-Aktivität (Wassmann *et al.*, 2005) in Antwort auf MPA gezeigt werden. Interessanterweise wurde außerdem beschrieben, dass MPA koronare Vasospasmen in Affen begünstigt, was ebenfalls ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko impliziert (Miyagawa *et al.*, 1997).

Die erhobenen Daten zeigen, dass diese in den *in vivo*-Experimenten an Mäusen erzielten Ergebnisse hinsichtlich der arteriellen Thrombose in Antwort auf MPA und MPA/Estradiol mit den Resultaten klinischer Studien korrelieren, die zeigten, dass eine kombinierte Hormonersatztherapie mit Estrogenen und MPA ein erhöhtes Risiko für Myokardinfarkt und Schlaganfall mit sich bringt (Anderson *et al.*, 2004; Hulley *et al.*, 1998; Rossouw *et al.*, 2002; Rossouw *et al.*, 2007; Vickers *et al.*, 2007). Als mechanistische Schlussfolgerung aus den Experimenten kann festgehalten werden, dass der prothrombotische Effekt von MPA in Verbindung mit einer gesteigerten Thrombin-Bildung und/oder im Fall der kombinierten MPA/Estradiol-Substitution in Verbindung mit einem *Remodelling* der extrazellulären Matrix der arteriellen Wand/der atherosklerotischen Läsionen, einschließlich erhöhter Hyaluronsäure-Akkumulation, steht. Diese Ergebnisse stellen neue mechanistische Erklärungen für das „Versagen“ der kardiovaskulären Protektion einer kombinierten Hormonersatztherapie, insbesondere mit Hinblick auf zelluläres und strukturelles *Remodelling*, dar.

5.1.2.8 Matrix-Pharmakologie

Es ist in diesem Zusammenhang interessant, dass bereits in früheren Untersuchungen beschrieben wurde, dass unterschiedliche Bestandteile der EZM durch Pharmaka aus verschiedenen Medikamentenklassen, wie AT₁-Antagonisten, Statinen und COX-Inhibitoren beeinflusst werden können.

Der Prozess der Atherogenese ist, wie einleitend beschrieben, unter anderem durch eine phasenspezifische Akkumulation und eine extensive Umstrukturierung der EZM charakterisiert. Proteoglykane, HA und Kollagen sind in diesem Kontext sowohl funktionell als auch strukturell wichtige EZM-Moleküle, die im Bereich der Neointima von atherosklerotischen Plaques akkumulieren. Zwei wichtige Proteoglykane, die zur Klasse der kleinen leucinreichen Proteoglykane gehören, sind Biglykan und Decorin.

AT₁-Antagonisten: Das Peptidhormon Angiotensin-II beeinflusst über den Rezeptor-Subtyp AT₁ den Blutdruck, wobei verschiedene Mechanismen wie Vasokonstriktion, erhöhte renale Natriumrückresorption und Steigerung der Aldosteronsekretion in den Nebennieren beteiligt sind. Eine Pharmakotherapie mit dem selektiven Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp AT₁-Antagonisten Telmisartan senkt somit den Blutdruck. Bezogen auf die Zusammensetzung der EZM konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Telmisartan die Biglykan-Akkumulation in atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs im Kontext einer fortgeschrittenen Atherosklerose reduzierte und so spezifisch die Proteoglykan-Matrix-Zusammensetzung fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen beeinflusste (Nagy *et al.*).

Statine: Die Statine umfassen eine Medikamentenklasse, die auch als Lipidsenker bekannt sind und die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) inhibieren. Aufgrund der Tatsache, dass HMG-CoA ein Zwischenprodukt der menschlichen Cholesterinsynthese ist, werden Statine bislang hauptsächlich als Cholesterinsenker eingesetzt. Bedingt durch die Therapie herrscht in den Zellen ein relativer Cholesterinmangel, was dazu führt, dass sie vermehrt LDL-Rezeptoren produzieren, die das LDL aus dem Blut durch Endozytose aufnehmen. LDL wird dadurch aus dem Blutkreislauf entfernt, wodurch sich der LDL-Spiegel im Blut und damit auch Wirkungen des LDL wie Progression der Atherosklerose verringern. Die Behandlung mit Statinen führte in ApoE^{-/-} Mäusen zu einem massiven Anstieg von Decorin und Biglykan in atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs und der *arteria brachiocephalica*. Auch in Endatherektomien von mit Statinen behandelten Patienten konnte eine gesteigerte Decorin- und Biglykan-Akkumulation gezeigt werden. Darüber hinaus führte eine Langzeitbehandlung mit Rosuvastatin in Mäusen zu einer kondensierten kollagenreichen Matrix, was zusammen mit der gesteigerten Akkumulation von Decorin und Biglykan zu einem stabileren Plauephänotyp beitragen könnte (Marzoll *et al.*, 2009a).

COX-Inhibitoren: Pharmakologische Inhibition der Prostaglandinsynthese durch Applikation nicht selektiver COX-Inhibitoren, die auch als nicht-steroidale anti-inflammatorische Pharmaka (NSAIDs) bekannt sind, finden breite Anwendung für Indikationen, die antipyretische, antiinflammatorische und analgetische Therapiestrategien verlangen. Zusätzlich wird niedrig dosierte Acetylsalicylsäure auch zur Prävention thromboembolischer Komplikationen in Patienten mit KHK eingesetzt. Für COX2 spezifische Inhibitoren (Coxibe) wurden entwickelt, um das Risiko gastrointestinaler Komplikationen, die normalerweise mit NSAIDs einhergehen, zu mildern. Da sowohl NSAIDs als auch Coxibe für die symptomatische Behandlung von Patienten mit Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis verwendet werden, findet die Behandlung häufig über einen langen Zeitraum statt und schließt Patienten mit Atherosklerose und KHK ein. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass die intimale HA-Akkumulation sowohl durch den unspezifischen COX-Inhibitor Indomethazin als auch durch den für COX2 spezifischen Inhibitor Rofecoxib stark reduziert wurde. Dies ging einher mit einer massiven Inhibition der HAS1- und HAS2-mRNA Expression (Marzoll *et al.*, 2009b). Diese Modulation der vaskulären HA-Akkumulation könnte eine Rolle für chronische Effekte von COX-Inhibitoren auf die Progression der Atherosklerose spielen.

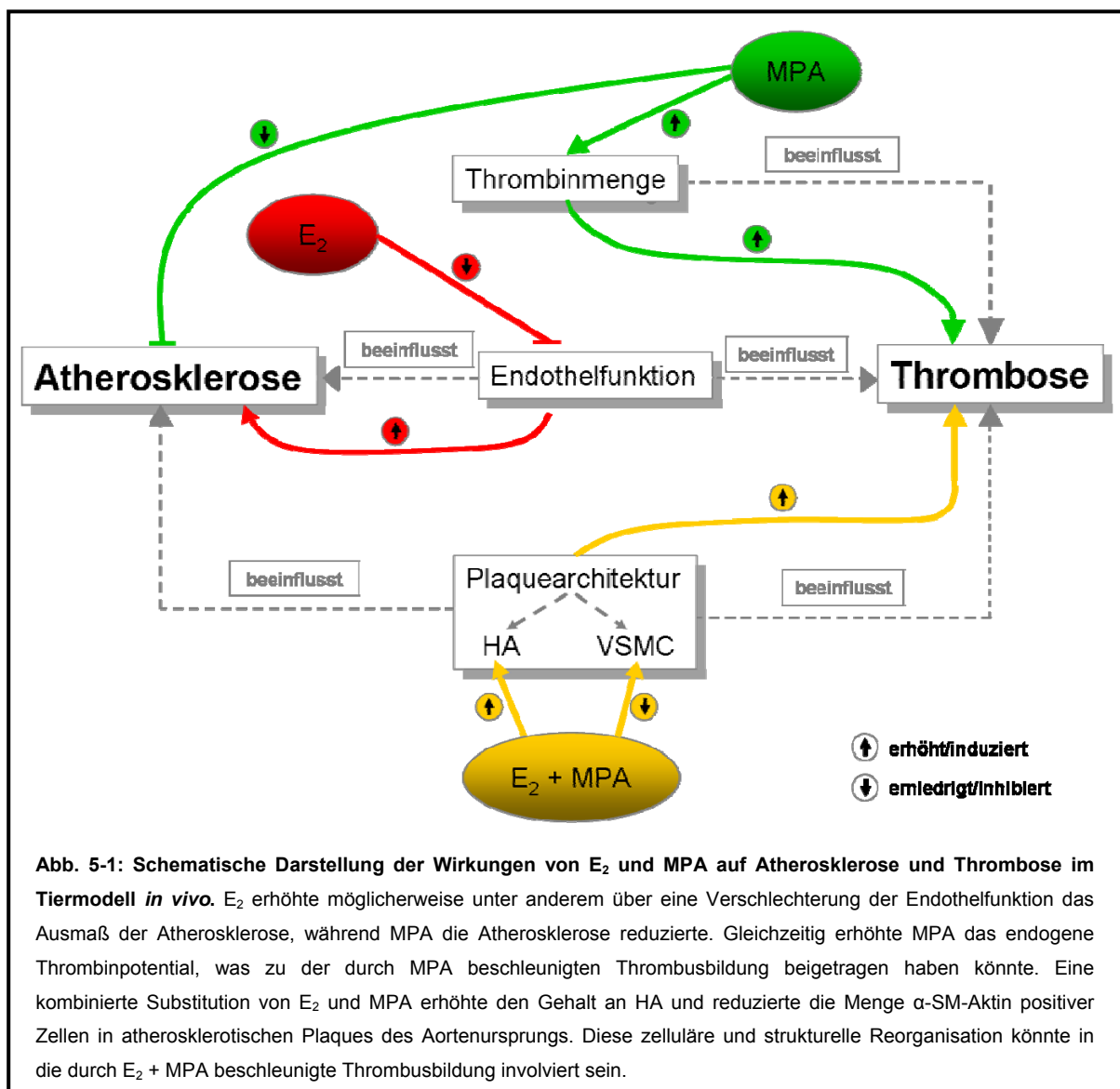
In dieser Arbeit wurden mit Estrogen/Gestagen-Kombinationen weitere für die Pharmakotherapie relevante Regulatoren des vaskulären Matrixumbaus und spezifisch der HA-Synthese identifiziert. Diese neuen Erkenntnisse erweitern das Wissen um EZM-Bestandteile, insbesondere HA, als Zielstrukturen pharmakologischer Interventionen im Kontext der Atherosklerose und Thrombose und tragen so zu einem vollständigeren Verständnis der durch Pharmaka induzierten Veränderungen in Struktur und Expression der extrazellulären Matrix bei.

Zukünftig sind weiterführende Studien von Nöten, um die Rolle hyaluronsäurereicher Matrix in der arteriellen Antwort auf MPA und MPA/Estradiol weiter zu untersuchen.

5.1.3 Resumée

Zusammenfassend demonstriert die vorstehend beschriebene *in vivo*-Untersuchung zum ersten Mal, dass endogenes und in physiologischen Dosierungen exogen appliziertes Estradiol die Atherosklerose in einem murinen Modell der akzellerierten

Atherosklerose, wahrscheinlich bedingt durch eine eingeschränkte Endothelfunktion, beschleunigen können. Im Gegensatz dazu war MPA in diesem Mausmodell – sowohl alleine als auch in Kombination mit Estradiol – stark prothrombotisch, obwohl es gleichzeitig die Atherosklerose inhibierte. Mögliche Mechanismen schließen eine gesteigerte Thrombinbildung und Veränderungen in der vaskulären Genexpression ein, die in einer veränderten Matrix-Struktur innerhalb der Plaques und einem abgeänderten Phänotyp glatter Muskelzellen münden.



5.1.4 Ausblick

Bei der Frage nach der Validität des Modells und der Möglichkeit die an diesem Tiermodell gewonnenen Erkenntnisse perspektivisch tatsächlich auf klinische Fragestellungen übertragen zu können, ist immer zu berücksichtigen, dass es

Limitationen von Tiermodellen gibt, die eine Translation auf humanmedizinische Anwendungen einschränken. Nichts desto trotz teilt unser Modell zahlreiche Eigenschaften der humanen Atherosklerose und erlaubt eine Hormonsubstitution in Anlehnung an die in der Humantherapie geltenden Therapieschemata. Pathophysiologische Beobachtungen aus der Humanmedizin, die den Prozess der Atherogenese und die Erkrankung der Atherosklerose charakterisieren, können auch im ApoE^{-/-}-Modell nachvollzogen werden: Hypercholesterinämie bei Menschen, die auch in allen in unseren Tierversuchen charakterisierten Tieren nachgewiesen werden konnte, führt zu einer erhöhten LDL-Retention im subendothelialen Raum und nachfolgend zu dessen Aggregation und Oxidation, was zu einer Ausprägung von Endothelschäden führt und den atherogenen Prozess an aufgrund hämodynamischer und mechanischer Kräfte anfälligen Stellen im Gefäßsystem initiiert (Hodgin *et al.*, 2002). ApoE^{-/-}-Mäuse entwickeln dementsprechend unter entsprechenden diätischen Bedingungen spontan Atherosklerose, die durch einfache und komplizierte Läsionen charakterisiert ist, die denen von Menschen sehr ähneln (Rosenfeld *et al.*, 2000).

Dennoch konnten aber klinische Studien, anders als eine E₂-Behandlung in der Maus, keine Protektion durch E₂ zeigen und beschrieben ein erhöhtes Risiko kardiovaskulärer Schäden nach HRT, sowohl für die Primär- (Rossouw *et al.*, 2002) als auch für die Sekundärprävention (Hulley *et al.*, 1998). Es war daher bislang unmöglich, Resultate aus tierexperimentellen Versuchen mit Beobachtungen aus humanen Studien abzugleichen, was der Verwendung des Mausmodells entgegenstand. Darüber hinaus ist es wichtig zu beachten, dass in den klinischen Studien mit „Myokardinfarkt“ und „Tod in Folge koronarer Herzerkrankung“ Endpunkte gewählt wurden, die späte thrombotische Ereignisse reflektieren. (Spontane) Plaquerupturen und nachfolgende Thrombosen, die klinischen Ereignissen wie Myokardinfarkt vorausgehen, finden aber in atherosklerotischen Mausmodellen nicht statt (Hodgin *et al.*, 2002) und stellen so eine Limitation der Möglichkeit der Translation in die Humanmedizin dar.

Bei der Interpretation von Ergebnissen darf hinsichtlich der Applikationsart und -formulierung auch nicht außer Acht gelassen werden, dass beim Menschen transdermale Applikationen anders als orale Formulierungen, die in den klinischen Studien „WHI“ und „HERS“ verwendet wurden, den *first-pass*-Effekt der Leberpassage umgehen, woraus weniger positive Effekte auf das Lipidprofil

resultieren, gleichzeitig aber die Induktion von Angiotensinogen und C-reaktivem Protein vermieden werden (Hodgin *et al.*, 2002). Die ESTHER Studie bestätigte, dass orale Estrogene einen signifikanten Anstieg thromboembolischer Ereignisse bedingen und legt nahe, dass die transdermale Applikation nicht mit einer Erhöhung des Risikos für thromboembolische Komplikationen assoziiert ist (Hodgin *et al.*, 2002). Die subkutane Substitution in den vorliegenden Experimenten scheint somit hinsichtlich des fehlenden Effektes auf die Thrombusbildung nach subkutaner E₂-Substitution und bezogen auf pro-atherogene E₂-Effekte sowie pro-thrombotische Effekte der kombinierten Gestagen/Estrogen-Substitutionstherapie gut mit Endpunktdaten aus Studien beim Menschen (ESTHER, WHI und HERS) zu korrelieren.

Erstmalig steht somit ein Mausmodell zu Verfügung, mit dem mechanistisch die negativen Effekte von MPA und Estradiol partiell aufgeklärt werden konnten und der Frage nachgegangen werden konnte, welche Gründe zu dem „Versagen“ der kardiovaskulären Protektion der Hormonersatztherapie geführt haben könnten. In Zukunft sollten an diesem Mausmodell weitere mechanistische Untersuchungen durchgeführt werden, um Ursachen für die negativen Effekte einer HRT oder ERT auf das kardiovaskuläre System zu evaluieren und so zu einem besseren Verständnis von Estrogenen und Gestagenen hinsichtlich ihres kardiovaskulären Risikoprofils beizutragen.

Darüber hinaus könnte es von großem klinischen Interesse sein, an dem beschriebenen Mausmodell durch Verwendung alternativer Progesteronderivate, die sich von MPA hinsichtlich agonistischer oder antagonistischer Wirkungen auf andere Steroidrezeptoren unterscheiden, in zukünftigen Studien zu evaluieren, ob der prothrombotische Effekt des MPA von seinem antiatherosklerotischen Effekt differenziert werden kann. Dies bietet die Perspektive, zu einem besseren Nutzen/Risiko-Verhältnis postmenopausaler Hormonersatztherapien beizutragen.

5.2 Zellversuche

5.2.1 Effekte von Estradiol auf humane, glatte Gefäßmuskelzellen

In den vorstehend beschriebenen Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass Estradiol, wenn es nach experimenteller Menopause bei akzellerierter

Atherosklerose in physiologischen Dosierungen substituiert wird, pro-atherosklerotische Effekte hat.

Nichts desto trotz scheinen Estrogene auch durch epidemiologische Daten belegt (Grodstein *et al.*, 2003; Grodstein *et al.*, 1995) in jungen Frauen oder in Frauen, die direkt mit dem Erreichen der Menopause mit Estrogenen substituiert werden, atheroprotektiv zu wirken. In diesem Zusammenhang könnte es von Bedeutung sein, dass die Evolution intimaler Läsionen prinzipiell mit einer zunehmenden Akkumulation glatter Gefäßmuskelzellen in den atherosklerotischen Plaques einhergeht, was eine Steigerung der proliferativen und/oder migratorischen Kapazität dieser Zellen impliziert. Dies kann auch eine Transition der glatten Muskelzellen von differenzierten in proliferierende, dedifferenzierte Zellen einschließen. Die Mechanismen, die der Migration glatter Muskelzellen in die Intima unterliegen und die Modulation glatter Muskelzellen hin zum proliferierenden synthetischen Phänotyp bedingen, sind von Ross ausführlich beschrieben (Ross, 1981).

PDGF ist dabei einer der Faktoren, die essentiell in Atherosklerose und Restenose involviert sind (Raines *et al.*, 1996). PDGF wird in normalen Arterien nicht exprimiert, während er in atherosklerotischen Läsionen aufreguliert wird. Die Läsionen aller Entwicklungsstufen bei Menschen und bei nicht-humanen Primaten enthalten die PDGF-BB-Isoform. Es konnte gezeigt werden, dass PDGF-BB essentiell in die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen involviert (Grotendorst *et al.*, 1982; Grotendorst *et al.*, 1981; Hart *et al.*, 1988; Ross *et al.*, 1986) und der wichtigste, pro-migratorische Faktor für glatte Muskelzellen innerhalb der PDGF-Familie ist. PDGF-AA dagegen hat inhibitorische Effekte auf die Migration von glatten Muskelzellen (Koyama *et al.*, 1992). Interessanterweise haben einige Experimente gezeigt, dass Estrogene die durch PDGF induzierte Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen *in vitro* inhibieren (Dai-Do *et al.*, 1996; Kappert *et al.*, 2006; Kolodgie *et al.*, 1996; Somjen *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1996). Es gibt aber auch Untersuchungen, die diesen inhibitorischen Effekt von Estrogenen (Akishita *et al.*, 1997; Bhalla *et al.*, 1997; Dai-Do *et al.*, 1996; Kappert *et al.*, 2006; Montague *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 1993) auf die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen nicht beschreiben, sondern im Gegenteil zeigen, dass Estrogene die [³H]-Thymidin Inkorporation und Proliferation steigern (Farhat *et al.*, 1992; Keyes *et al.*, 1996; Ling *et al.*, 2004; Song *et al.*, 1998). Estrogen-Rezeptoren wurden im Endothel und auf glatten

Gefäßmuskelzellen verschiedener Säugetiere wie Kaninchen (Stumpf *et al.*, 1977), Pavianen (Lin *et al.*, 1986a; Lin *et al.*, 1982) und Ratten (Lin *et al.*, 1986b; Orimo *et al.*, 1993) nachgewiesen. Estrogen bindet dabei an zwei distinkte Estrogen-Rezeptoren, namentlich ER α und ER β , die auf allen vaskulären Zelltypen exprimiert werden (Mendelsohn *et al.*, 1999). Dies zeigt, dass Estrogene eine Rolle in der Regulation der Funktion vaskulärer Zellen spielen (Suzuki *et al.*, 1996). Wir konnten eine reduzierte proliferative Kapazität von VSMC in Antwort auf Estradiol zeigen. Mechanistisch war dies mit einer reduzierten Phosphorylierung von ERK1/2 verbunden, die von PDGF abhängige, zelluläre Antworten wie Zellzyklus-Progression, Migration und Überleben mediiert (Rosenkranz *et al.*, 1999). Diese Effekte auf die ERK-Phosphorylierung stimmen mit früheren Untersuchungen überein, die ebenfalls einen inhibitorischen Effekt von Estradiol auf die ERK-Phosphorylierung zeigten, welche wiederum mit Veränderungen in der katalytischen Aktivität der Kinase einhergingen (Mori-Abe *et al.*, 2003). Darüber hinaus konnten Kappert *et al.* zeigen, dass Estrogene durch Inhibition von rac-1 PDGF-induzierte, zelluläre Antworten in glatten Gefäßmuskelzellen durch Beeinflussung der durch PDGF induzierten Signaltransduktion auf Post-Rezeptor-Ebene beeinflussen. Des Weiteren postulierten Ding *et al.*, dass die Bindung von Estrogenen an seine Rezeptoren zu einer Stimulation der Proteinkinase A und einer nachfolgenden Inhibition der ERK-Aktivität führen (Ding *et al.*, 2009). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass 17- β -Estradiol den anti-proliferativen Effekt von mit PDGF stimulierten, glatten Gefäßmuskelzellen auch durch Inhibition der pRB-Phosphorylierung ausübt und diese inhibitorischen Effekte des Estrogens hauptsächlich durch den Estrogenrezeptor α vermittelt werden (Takahashi *et al.*, 2003). Einige Experimente schlagen vor, dass eher Estradiol-Metabolite als Estradiol selber für die antiproliferativen Effekte verantwortlich sind (Barchiesi *et al.*, 2002; Zacharia *et al.*, 2003). Einer der Hauptmetabolite, „2-Methoxyestradiol“ (2-ME), induziert Effekte auf rac-1-Expression und Zellzyklusprogression, die identisch mit denen von Estradiol selber sind. Das zeigt, dass die Beeinflussung der rac-1-Expression/der PDGF-Signaltransduktion durch Estradiol zumindest partiell durch seine Metabolite vermittelt wird (Kappert *et al.*, 2006).

Der Phänotyp vaskulärer Zellen unterliegt einer für die Atherosklerose charakteristischen Reorganisation der Komposition vaskulärer extrazellulärer Matrix und ist daher phänotypischen, zellulären Veränderungen häufig vorgeschaltet. Es ist

in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse, dass Atherosklerose und Restenose wie einleitend beschrieben durch massive Veränderungen in Menge und Verteilung von HA charakterisiert sind. Mit Hinblick auf den atherosklerotischen Kontext und das *Remodelling* extrazellulärer Matrix konnte in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass sowohl die Expression von HAS1 (van den Boom *et al.*, 2006) als auch von HAS2 (Meyer-Kirchrath *et al.*, 2004; Sussmann *et al.*, 2004) durch vasodilatorische Prostaglandine induziert wird. Ob die durch die verschiedenen Isoformen synthetisierte Hyaluronsäure auch unterschiedliche Effekte auf glatte Gefäßmuskelzellen und die Progression der Atherosklerose hat, wurde durch selektive Inhibition der Expression durch siRNA evaluiert. Nach Herabregulation der HAS2-Expression durch siRNA zeigten humane, glatte Gefäßmuskelzellen eine Inhibition der G1/S-Progression und Zellproliferation (van den Boom *et al.*, 2006). Zusätzlich war die Migration beeinträchtigt (Sussmann *et al.*, 2004). HAS2 könnte also die HAS-Isoform sein, die für die Ausbildung HA-reicher perizellulärer Matrices verantwortlich ist, die wiederum für die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen von Nöten sind. Eine glattmuskelzellspezifische HAS2-Überexpression in ApoE^{-/-}-Mäusen beschleunigte dementsprechend die Atherosklerose und erhöhte darüber hinaus die Steifheit der arteriellen Gefäßwand (Chai *et al.*, 2005). Es ist aber nur wenig über den Einfluss von Estrogenen auf die extrazelluläre Matrix bekannt. Daher wurde untersucht, ob *in vitro* durch Estradiol spezifische Veränderungen in der Expression der Matrixkomponente Hyaluronsäure bei VSMC induziert werden können und ob diese in die antiproliferativen Effekte von Estradiol involviert sein könnten. Um Effekte von Estradiol auf die HA-Synthese und die Expression der die Hyaluronsäure synthetisierenden Enzyme (HAS1, 2 und 3) in einem „atherosklerotischen Kontext“ *in vitro* zu untersuchen, wurden glatte Gefäßmuskelzellen mit PDGF-BB alleine oder in Kombination mit Estradiol stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von Hyaluronsäure in das Medium durch E₂ stark reduziert war. Einhergehend damit wurde sowohl die mRNA-Expression von HAS1 als auch von HAS2 durch Estradiol signifikant reduziert. Die Expression von HAS3 war ebenso wenig beeinflusst, wie die der HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM und des Hyaladherins Versican. Das Elutionsprofil einer Gelchromatographie zeigte, dass sich das Molekulargewicht der Hyaluronsäure durch 100 nM E₂ in den Bereich niedermolekularerer Größenordnungen verschob. Zur Analyse eventueller durch E₂ induzierter

Veränderungen in der Morphologie der Zellen, einschließlich der perizellulären Struktur der HA-Matrix, wurden mit PDGF-BB alleine oder in Kombination mit Estradiol stimulierte glatte Gefäßmuskelzellen immunzytochemisch für HA und Zellkerne gefärbt. In allen Zellen konnten lange sich von den Zellkörpern ausgehend in den perizellulären Raum erstreckende HA-Kabel identifiziert werden. HA-Kabel werden prinzipiell als perizelluläre Strukturen diskutiert, die in die Retention von Makrophagen involviert sind und über die Rekrutierung von Leukozyten an inflammatorischen Prozessen beteiligt sein könnten (de la Motte *et al.*, 2003). Unter dem Einfluss von E₂ zeigten sich aber keine Unterschiede in Quantität und Qualität der HA-Kabel, so dass durch E₂ keine Änderungen in der perizellulären HA-Matrix induziert werden.

Die durch Estradiol induzierte Abnahme der HA-Sekretion und -Synthese von VSMC steht in Einklang mit einer Studie von Gopala *et al.*, die eine stark reduzierte HA-Menge im Knochen ovariectomierter Ratten, die mit Estradiol substituiert wurden, zeigen konnten (Gopala Krishnan *et al.*, 2003). In Hinblick auf kardiovaskuläre Fragestellungen, wurde gezeigt, dass die Zusammensetzung von Glykosaminoglykanen in der Intima-Media thorakaler Aorten von mit Estrogenen gefütterten Kaninchen durch eine ausgeprägte Reduktion des HA-Gehalts charakterisiert war (Aikawa *et al.*, 1984). Im Gegensatz dazu wurde die HA-Synthese in Zervixfibroblasten durch 17-β-Estradiol stimuliert, war aber in Hautfibroblasten *in vitro* nicht verändert (Tanaka *et al.*, 1997). *In vivo* jedoch zeigten Uzuka *et al.* nach Substitution von Estrogenen eine Stimulation der HA-Synthese in der Haut von Mäusen (Uzuka *et al.*, 1981). Diese divergierenden Daten machen deutlich, dass estradiolabhängige Effekte auf die HA-Synthese stark von Zelltyp, experimentellen Bedingungen und physiologischem/pathologischem Kontext abhängig sind.

5.2.2 Estrogenrezeptorabhängigkeit und *in silico* Analyse

Um aber die Regulation der transkriptionellen Inhibition von HAS1 und HAS2 durch E₂ weitergehend zu analysieren, wurden *in silico* Analysen einer putativen Promotorregion 1000bp oberhalb des Transkriptionsstarts beider Gene durchgeführt. In jeder der Promotoreregionen der beiden Gene wurden Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NFκB und CREB identifiziert. Beides sind bekannte Transkriptionsfaktoren am Ende des ERK/MAPK-Signaltransduktionswegs.

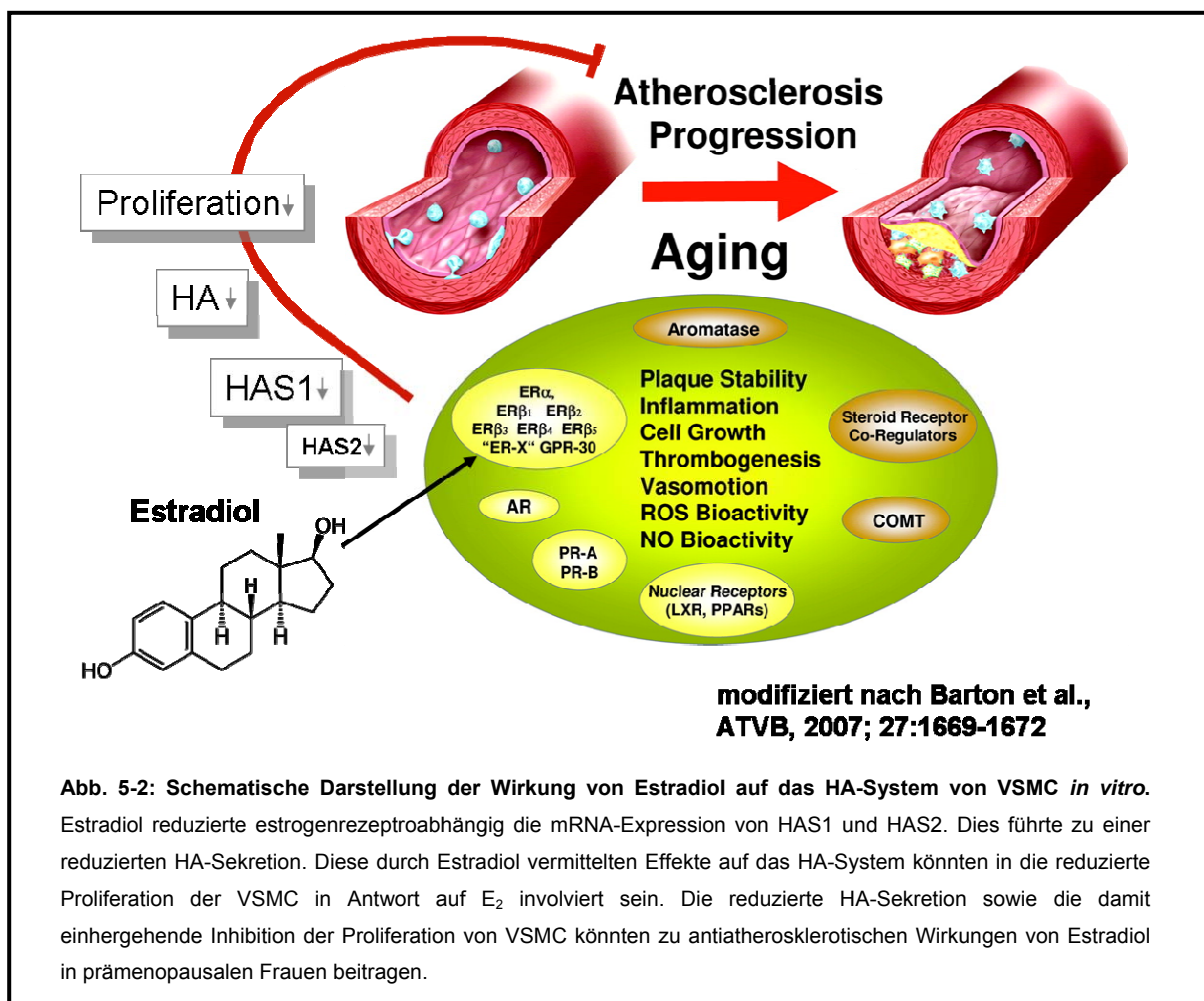
Interessanterweise zeigte die *in silico*-Analyse darüber hinaus 4 estrogenresponsive Elemente (ERE) in der Promotorregion des HAS1-Gens während kein ERE in der HAS2-Promotorregion detektiert wurde. Das Vorhandensein der ERE ist Evidenz dafür, dass es sich bei der durch E₂ beeinflussten Regulation der HAS1-mRNA-Expression um einen genomischen Mechanismus handeln könnte, bei dem Estrogen/Estrogenrezeptorkomplexe an die *in silico* detektierten ERE binden und so die Transkription direkt beeinflussen könnten. Prinzipiell kann von dem Vorhandensein von estrogenresponsiven Elementen nicht auf eine induzierende oder inhibierende Regulation der Transkription geschlossen werden: Die durch Estrogen/Estrogenrezeptor-Komplexe vermittelten Effekten auf die Transkription bestimmter Zielgene gehen – ähnlich wie bei der Regulation der Transkription durch Bindung von Glukokortikoid/Glukokortikoidrezeptor-Komplexen an glukokortikoidresponsive Elemente – mit der Rekrutierung einer Vielzahl von Koaktivatoren (Induktion der Transkription) oder Korepressoren (Inhibition der Transkription) einher und können die Transkription so in die eine oder die andere Richtung beeinflussen. In den hier beschriebenen Experimenten könnte aufgrund der Reduktion der mRNA Expression von HAS1 ein inhibitorischer Komplex mit Korepressoren an der Regulation der HAS1 mRNA Expression beteiligt sein. Außerdem könnte das Vorhandensein der estrogenresponsiven Elemente in der Promotorregion des HAS1-Gens eine Erklärung dafür sein, dass die Reduktion der mRNA-Expression von HAS1 deutlicher ausfällt als die Reduktion der HAS2-mRNA-Expression.

Die durch Estradiol reduzierte Expression von HAS1 wurde durch Antagonisierung der Estrogenrezeptoren mit dem Estrogenrezeptor α - und β -Antagonisten ICI182780 blockiert. Aber auch die Reduktion der HAS2-mRNA-Expression wurde durch Antagonisierung der Estrogenrezeptoren aufgehoben. Dieses Ergebnis zeigt, dass die reduzierte HAS1- und HAS2-mRNA-Expression estrogenrezeptorabhängig ist.

5.2.3 Lentivirale Überexpression von HAS1 und HAS2

Um zu analysieren, ob die durch Estradiol reduzierte Expression von HAS1 und HAS2 auch tatsächlich in die estradiolvermittelte Inhibition der durch PDGF-BB induzierten Proliferation von humanen, glatten Gefäßmuskelzellen involviert ist, wurden beide HAS-Isoformen (sowohl HAS1 als auch HAS2) mittels lentiviraler Vektoren überexprimiert und die Zellen nachfolgend mit PDGF-BB alleine oder in

Kombination mit Estradiol stimuliert. Die Experimente wurden dabei so durchgeführt, dass die Überexpression jeder der beiden Isoformen, HAS1 und HAS2, zu einem Anstieg der Hyaluronsäure-Sekretion in das Medium führte, die im gleichen Konzentrationsbereich lag, um so Rückschlüsse auf die Rolle der jeweiligen Isoform ziehen zu können. Die durch Estradiol induzierte Inhibition der Proliferation wurde durch Überexpression der HAS1- und HAS2-Isoenzyme aufgehoben. Diese Daten unterstützen die Schlussfolgerung, dass die Reduktion der HAS1- und HAS2-mRNA-Expression in die estradiolvermittelte Inhibition der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen involviert ist. Mechanistisch kann dies über eine Regulation der MAP-Kinase-Kaskade erklärt werden, weil sowohl die Überexpression von HAS1 als auch die Überexpression von HAS2 die durch Estradiol vermittelte Hemmung der ERK-Phosphorylierung aufhoben.



Diese *in vitro*-Experimente führen zum ersten Mal Evidenzen für einen neuen molekularen Aspekt der antiproliferativen Wirkungen von E₂ an, der die

Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und deren Signaltransduktion betrifft: Die durch HAS1 und HAS2 induzierte Hyaluronsäuresynthese wurde als neue Zielstruktur estradiolvermittelter Effekte in VSMC identifiziert. Es kann spekuliert werden, dass die durch Estradiol vermittelte Abnahme der HAS1 und HAS2 in prämenopausalen oder postmenopausalen Frauen, die sofort bei Erreichen der Menopause mit Hormonen substituiert werden, zu antiatherosklerotischen E₂-Effekten beiträgt, weil so (a) der proliferative Phänotyp humaner, glatter Gefäßmuskelzellen inhibiert wird und (b) keine hoch hydratisierte Matrix mehr gebildet wird, die durch Volumenexpansion von atherosklerotischen Läsionen zu einer zunehmenden luminalen Verengung arterieller Gefäße führen könnte.

6. Zusammenfassung

Eine postmenopausale Hormon-Ersatztherapie (HRT) mit Estrogenen alleine oder in Kombination mit Gestagenen wurde lange Zeit eingesetzt, um typische Wechseljahresbeschwerden wie z.B. Hitzewallungen zu bessern. Außerdem wurde sie bei postmenopausaler Osteoporose zum Erhalt der Knochendichte eingesetzt. Gleichzeitig ging man davon aus, dass die aus den genannten Indikationen behandelten Frauen ein geringeres kardiovaskuläres Risiko im Vergleich zu nicht mit Estrogen/Gestagen behandelten Frauen aufweisen würden. Ende 2002 ist dieses Konzept jedoch in Frage gestellt worden, weil zu jenem Zeitpunkt mit der „*World Health Initiative*“-Studie eine der größten randomisierten, plazebokontrollierten Studien zu diesem Thema abgebrochen werden musste. Die erhofften positiven, kardiovaskulären Effekte der HRT konnten nicht verifiziert werden. Im Gegenteil, in der Gruppe der Frauen, die eine HRT erhielten, zeigte sich sogar eine erhöhte Inzidenz für Schlaganfall und Myokardinfarkt. Daher sind neue tierexperimentelle Untersuchungen und Modelle erforderlich, um die molekularen Mechanismen, über die Estrogene und Gestagene die Pathophysiologie der Atherosklerose und nachfolgend das Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen modulieren, zu analysieren.

Ziel der Doktorarbeit war es, erstmals ein Mausmodell zu etablieren, mit dem die in der Humanmedizin beobachteten negativen Effekte einer HRT nachgestellt werden können.

Diese Zielvorstellung wurde durch bilaterale Ovariectomie (OVX) von Apolipoprotein E (ApoE)-defizienten Mäusen und nachfolgende Hormonsubstitution mit Plazebo und 17- β -Estradiol (E_2 , 1.1 $\mu\text{g}/\text{Tag}$) erreicht: Die Besonderheit dieses Modells liegt – im Vergleich zu allen bislang verwendeten Tiermodellen zur Untersuchung der Effekte von E_2 auf das Herz-Kreislaufsystem – in der Kombination aus einem langen Applikationszeitraum von 90 Tagen, der Fütterung einer stark atherogenen Diät und der Substitution von E_2 in physiologischen Dosierungen.

Das Ausmaß der Atherosklerose in Gesamtaorten-*en-face*-Präparationen, sowie die Plaqueflächen im Aortenursprung waren bei Tieren, die nach OVX mit 1,1 $\mu\text{g } E_2/\text{Tag}$ substituiert worden sind, signifikant erhöht. Gestützt wurde dieser pro-atherosklerotische Effekt von E_2 durch die beobachtete reduzierte Atherosklerose nach OVX im Vergleich mit nicht ovariectomierten Kontrolltieren. Der pro-atherosklerotische Effekt physiologischer E_2 -Spiegel könnte mechanistisch in

Zusammenhang mit einer verschlechterten Endothelfunktion stehen, da die Analyse der Vasorelaxation thorakaler Aortenringe in Organbadversuchen bei OVX-Tieren eine signifikant verbesserte Acetylcholin (ACh)-induzierte Relaxation zeigte, die durch E₂-Substitution wieder verschlechtert wurde. Die Thromboseneigung wurde in dem Modell weder durch OVX noch durch E₂ beeinflusst.

Das etablierte Mausmodell wurde anschließend verwendet, um die Effekte einer Substitution eines Gestagens alleine oder in Kombination mit E₂ hinsichtlich ihrer Effekte auf die Atherothrombose zu untersuchen.

In Anlehnung an die WHI-Studie wurde als Gestagenkomponente Medroxyprogesteronacetat, MPA, (27,7 µg/Tag) gewählt und nach OVX alleine oder in Kombination mit 1,1 µg E₂/Tag substituiert. In Mäusen, die mit MPA alleine oder der Kombination aus E₂ und MPA behandelt wurden, zeigte sich im Modell der photochemisch induzierten Thrombose ein erhöhtes thrombotisches Potential. Der prothrombotische Effekt von MPA liegt vermutlich an einer gesteigerten maximalen Thrombingenerierung, der der Kombination aus Estradiol und MPA vermutlich an einem *Remodelling* atherosklerotischer Plaques: Kombiniert substituierte Tiere zeigten eine massive Hyaluronsäureakkumulation sowie eine starke Reduktion des Gehalts glatter Muskelzellen in der fibrotischen Kappe der atherosklerotischen Plaques.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der Gehalt glatter Muskelzellen durch OVX gesteigert und durch E₂-Substitution wieder partiell reduziert wurde. Das migratorische und proliferative Verhalten von glatten Gefäßmuskelzellen hängt u.a. von der Extrazellulärmatrix ab, einem für die Pathogenese und die klinische Symptomatik der Atherosklerose essentiellen Faktor. Das Matrixmolekül „Hyaluronsäure“ wird durch atherogene Mitogene wie PDGF-BB induziert und trägt über die Ausbildung hyaluronsäurereicher Matrices zum proproliferativen und promigratorischen Phänotyp glatter Muskelzellen bei. In *in vitro* Versuchen an humanen, glatten Gefäßmuskelzellen konnte gezeigt werden, dass Estradiol die Synthese von Hyaluronsäure durch Hemmung der mRNA Expression von HAS1 hemmt. Da *in silico* mehrere estrogenresponsive Elemente (ERE) in der Promotorregion des HAS1-Gens gefunden wurden, stellt HAS1 sehr wahrscheinlich ein direkt transkriptionell von E₂ reguliertes Gen dar. In der Folge konnte durch lentivirale Überexpression von HAS1 gezeigt werden, dass HAS1 essentiell für die

ERK-Phosphorylierung und die Proliferation von humanen glatten Gefäßmuskelzellen ist. Falls die estrogenvermittelte Hemmung der Hyaluronsäuresynthese auch *in vivo* zum Tragen kommt, ist sie wahrscheinlich den atheroprotektiven Effekten des Estradiols zuzuordnen, die bei Frauen vor der Menopause und vor der Entwicklung einer starken Atherosklerose vermutet werden. In dem hier etablierten Tiermodell war keine Inhibition der Hyaluronsäureakkumulation in den atherosklerotischen Plaques nachzuweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Mausmodell etabliert, das zum ersten Mal erlaubt, pro-atherosklerotische Effekte von physiologischen Estradioldosierungen darzustellen und das darüber hinaus insbesondere geeignet erscheint, anti-atherosklerotische Effekte des MPA von seinen pro-thrombotischen Effekten abzugrenzen und mechanistisch zu untersuchen. Außerdem steht ein Modell zur Verfügung, an dem das thrombotische Potential anderer Gestagene mit von MPA verschiedenen Rezeptorpartialwirkungen evaluiert werden kann.

7. *Referenzen*

(2006) Hormones and cardiovascular health in women. *Hum Reprod Update* **12**(5): 483-497.

Aikawa, J, Munakata, H, Isemura, M, Ototani, N, Yosizawa, Z (1984) Hormonal effects on glycosaminoglycans in thoracic aortas of rabbits. *Tohoku J Exp Med* **143**(1): 113-116.

Akishita, M, Ouchi, Y, Miyoshi, H, Kozaki, K, Inoue, S, Ishikawa, M, Eto, M, Toba, K, Orimo, H (1997) Estrogen inhibits cuff-induced intimal thickening of rat femoral artery: effects on migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **130**(1-2): 1-10.

Alberts, B, Johnson, A, Lewis, L, Raff, M, Roberts, K, Walter, P (2002) Molecular biology of the cell, 4th edition, Garland Science, New York

Ambrosio, G, Tritto, I, Golino, P (1997) Reactive oxygen metabolites and arterial thrombosis. *Cardiovasc Res* **34**(3): 445-452.

Anderson, GL, Limacher, M, Assaf, AR, Bassford, T, Beresford, SA, Black, H, Bonds, D, Brunner, R, Brzyski, R, Caan, B, Chlebowski, R, Curb, D, Gass, M, Hays, J, Heiss, G, Hendrix, S, Howard, BV, Hsia, J, Hubbell, A, Jackson, R, Johnson, KC, Judd, H, Kotchen, JM, Kuller, L, LaCroix, AZ, Lane, D, Langer, RD, Lasser, N, Lewis, CE, Manson, J, Margolis, K, Ockene, J, O'Sullivan, MJ, Phillips, L, Prentice, RL, Ritenbaugh, C, Robbins, J, Rossouw, JE, Sarto, G, Stefanick, ML, Van Horn, L, Wactawski-Wende, J, Wallace, R, Wassertheil-Smoller, S (2004) Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* **291**(14): 1701-1712.

Arbustini, E, Dal Bello, B, Morbini, P, Burke, AP, Bocciarelli, M, Specchia, G, Virmani, R (1999) Plaque erosion is a major substrate for coronary thrombosis in acute myocardial infarction. *Heart* **82**(3): 269-272.

Arnal, JF, Gourdy, P, Elhage, R, Garmy-Susini, B, Delmas, E, Bouchet, L, Castano, C, Barreira, Y, Couloumiers, JC, Prats, H, Prats, AC, Bayard, F (2004) Estrogens and atherosclerosis. *Eur J Endocrinol* **150**(2): 113-117.

Assmann, V, Marshall, JF, Fieber, C, Hofmann, M, Hart, IR (1998) The human hyaluronan receptor RHAMM is expressed as an intracellular protein in breast cancer cells. *J Cell Sci* **111** (Pt 12): 1685-1694.

Bajorath, J, Greenfield, B, Munro, SB, Day, AJ, Aruffo, A (1998) Identification of CD44 residues important for hyaluronan binding and delineation of the binding site. *J Biol Chem* **273**(1): 338-343.

Balla, G, Jacob, HS, Balla, J, Rosenberg, M, Nath, K, Apple, F, Eaton, JW, Vercellotti, GM (1992) Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* **267**(25): 18148-18153.

Ballinger, ML, Nigro, J, Frontanilla, KV, Dart, AM, Little, PJ (2004) Regulation of glycosaminoglycan structure and atherogenesis. *Cell Mol Life Sci* **61**(11): 1296-1306.

Banner, DW, D'Arcy, A, Chene, C, Winkler, FK, Guha, A, Konigsberg, WH, Nemerson, Y, Kirchhofer, D (1996) The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature* **380**(6569): 41-46.

Bar, J, Lahav, J, Hod, M, Ben-Rafael, Z, Weinberger, I, Brosens, J (2000) Regulation of platelet aggregation and adenosine triphosphate release in vitro by 17beta-estradiol and medroxyprogesterone acetate in postmenopausal women. *Thromb Haemost* **84**(4): 695-700.

Barchiesi, F, Jackson, EK, Gillespie, DG, Zacharia, LC, Fingerle, J, Dubey, RK (2002) Methoxyestradiols mediate estradiol-induced antimitogenesis in human aortic SMCs. *Hypertension* **39**(4): 874-879.

Barrett-Connor, E (2007) Hormones and heart disease in women: the timing hypothesis. *Am J Epidemiol* **166**(5): 506-510.

Bauss, F, Esswein, A, Reiff, K, Sponer, G, Muller-Beckmann, B (1996) Effect of 17beta-estradiol-bisphosphonate conjugates, potential bone-seeking estrogen pro-drugs, on 17beta-estradiol serum kinetics and bone mass in rats. *Calcif Tissue Int* **59**(3): 168-173.

Beral, V, Banks, E, Reeves, G (2002) Evidence from randomised trials on the long-term effects of hormone replacement therapy. *Lancet* **360**(9337): 942-944.

Beresford, SA, Weiss, NS, Voigt, LF, McKnight, B (1997) Risk of endometrial cancer in relation to use of oestrogen combined with cyclic progestagen therapy in postmenopausal women. *Lancet* **349**(9050): 458-461.

Bhalla, RC, Toth, KF, Bhatti, RA, Thompson, LP, Sharma, RV (1997) Estrogen reduces proliferation and agonist-induced calcium increase in coronary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* **272**(4 Pt 2): H1996-2003.

Bissell, MJ, Hall, HG, Parry, G (1982) How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol* **99**(1): 31-68.

Bourassa, PA, Milos, PM, Gaynor, BJ, Breslow, JL, Aiello, RJ (1996) Estrogen reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(19): 10022-10027.

Bourguignon, LY, Zhu, D, Zhu, H (1998) CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenic signaling and tumor progression. *Front Biosci* **3**: d637-649.

Bryzgalova, G, Lundholm, L, Portwood, N, Gustafsson, JA, Khan, A, Efendic, S, Dahlman-Wright, K (2008) Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**(4): E904-912.

Burnette, WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**(2): 195-203.

Camenisch, TD, Spicer, AP, Brehm-Gibson, T, Biesterfeldt, J, Augustine, ML, Calabro, A, Jr., Kubalak, S, Klewer, SE, McDonald, JA (2000) Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest* **106**(3): 349-360.

Carmeliet, P (2000) Proteinases in cardiovascular aneurysms and rupture: targets for therapy? *J Clin Invest* **105**(11): 1519-1520.

Cederroth, CR, Vinciguerra, M, Gjinovci, A, Kuhne, F, Klein, M, Cederroth, M, Caille, D, Suter, M, Neumann, D, James, RW, Doerge, DR, Wallimann, T, Meda, P, Foti, M, Rohner-Jeanrenaud, F, Vassalli, JD, Nef, S (2008) Dietary phytoestrogens activate AMP-activated protein kinase with improvement in lipid and glucose metabolism. *Diabetes* **57**(5): 1176-1185.

Chai, S, Chai, Q, Danielsen, CC, Hjorth, P, Nyengaard, JR, Ledet, T, Yamaguchi, Y, Rasmussen, LM, Wogensen, L (2005) Overexpression of hyaluronan in the tunica media promotes the development of atherosclerosis. *Circ Res* **96**(5): 583-591.

Chajara, A, Levesque, H, Courel, MN, Chauzy, C, Maingonnat, C, Bertrand, P, Delpech, B (1996) Hyaluronan and hyaluronectin production in injured rat thoracic aorta. *Atherosclerosis* **125**(2): 193-207.

Chajara, A, Raoudi, M, Delpech, B, Leroy, M, Basuyau, JP, Levesque, H (2000) Increased hyaluronan and hyaluronidase production and hyaluronan degradation in injured aorta of insulin-resistant rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(6): 1480-1487.

- Chen, Z, Yuhanna, IS, Galcheva-Gargova, Z, Karas, RH, Mendelsohn, ME, Shaul, PW (1999) Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* **103**(3): 401-406.
- Clarkson, TB, Anthony, MS, Wagner, JD (2001) A comparison of tibolone and conjugated equine estrogens effects on coronary artery atherosclerosis and bone density of postmenopausal monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* **86**(11): 5396-5404.
- Cole, GJ, Glaser, L (1986) A heparin-binding domain from N-CAM is involved in neural cell-substratum adhesion. *J Cell Biol* **102**(2): 403-412.
- Cole, GJ, Schubert, D, Glaser, L (1985) Cell-substratum adhesion in chick neural retina depends upon protein-heparan sulfate interactions. *J Cell Biol* **100**(4): 1192-1199.
- Corti, R, Hutter, R, Badimon, JJ, Fuster, V (2004) Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* **17**(1): 35-44.
- Crauwels, HM, Van Hove, CE, Holvoet, P, Herman, AG, Bult, H (2003) Plaque-associated endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice on a regular diet. Effect of human apolipoprotein AI. *Cardiovasc Res* **59**(1): 189-199.
- Csoka, AB, Frost, GI, Stern, R (2001) The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol* **20**(8): 499-508.
- Cullins, VE (1996) Noncontraceptive benefits and therapeutic uses of depot medroxyprogesterone acetate. *J Reprod Med* **41**(5 Suppl): 428-433.
- d'Uscio, LV, Baker, TA, Mantilla, CB, Smith, L, Weiler, D, Sieck, GC, Katusic, ZS (2001) Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**(6): 1017-1022.

Dai-Do, D, Espinosa, E, Liu, G, Rabelink, TJ, Julmy, F, Yang, Z, Mahler, F, Luscher, TF (1996) 17 beta-estradiol inhibits proliferation and migration of human vascular smooth muscle cells: similar effects in cells from postmenopausal females and in males. *Cardiovasc Res* **32**(5): 980-985.

Dai, G, Freudemberger, T, Zipper, P, Melchior, A, Grether-Beck, S, Rabausch, B, de Groot, J, Twarock, S, Hanenberg, H, Homey, B, Krutmann, J, Reifemberger, J, Fischer, JW (2007) Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases. *Am J Pathol* **171**(5): 1451-1461.

Danielsen, CC, Mosekilde, L, Svenstrup, B (1993) Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. *Calcif Tissue Int* **52**(1): 26-33.

Darblade, B, Pendaries, C, Krust, A, Dupont, S, Fouque, MJ, Rami, J, Chambon, P, Bayard, F, Arnal, JF (2002) Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. *Circ Res* **90**(4): 413-419.

Daugherty, A (2002) Mouse models of atherosclerosis. *Am J Med Sci* **323**(1): 3-10.

Davie, EW, Ratnoff, OD (1964) Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science* **145**: 1310-1312.

Davies, MJ, Richardson, PD, Woolf, N, Katz, DR, Mann, J (1993) Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J* **69**(5): 377-381.

Day, AJ, Prestwich, GD (2002) Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. *J Biol Chem* **277**(7): 4585-4588.

Day, SM, Reeve, JL, Myers, DD, Fay, WP (2004) Murine thrombosis models. *Thromb Haemost* **92**(3): 486-494.

de la Motte, CA, Hascall, VC, Drazba, J, Bandyopadhyay, SK, Strong, SA (2003) Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid:polycytidylic acid: inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function. *Am J Pathol* **163**(1): 121-133.

DeAngelis, PL (1999) Molecular directionality of polysaccharide polymerization by the *Pasteurella multocida* hyaluronan synthase. *J Biol Chem* **274**(37): 26557-26562.

DeGrendele, HC, Estess, P, Picker, LJ, Siegelman, MH (1996) CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte-endothelial cell primary adhesion pathway. *J Exp Med* **183**(3): 1119-1130.

Ding, Q, Gros, R, Limbird, LE, Chorzyczewski, J, Feldman, RD (2009) Estradiol-mediated ERK phosphorylation and apoptosis in vascular smooth muscle cells requires GPR 30. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**(5): C1178-1187.

Drexler, H, Hayoz, D, Munzel, T, Hornig, B, Just, H, Brunner, HR, Zelis, R (1992) Endothelial function in chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol* **69**(19): 1596-1601.

Dubey, RK, Gillespie, DG, Imthurn, B, Rosselli, M, Jackson, EK, Keller, PJ (1999) Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells. *Hypertension* **33**(1 Pt 2): 177-182.

Dubey, RK, Jackson, EK (2001) Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**(3): F365-388.

Elhage, R, Arnal, JF, Pieraggi, MT, Duverger, N, Fievet, C, Faye, JC, Bayard, F (1997) 17 beta-estradiol prevents fatty streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(11): 2679-2684.

Elhage, R, Maret, A, Pieraggi, MT, Thiers, JC, Arnal, JF, Bayard, F (1998) Differential effects of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein on fatty-streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **97**(3): 242-244.

Evanko, SP, Angello, JC, Wight, TN (1999) Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(4): 1004-1013.

Evanko, SP, Raines, EW, Ross, R, Gold, LI, Wight, TN (1998) Proteoglycan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics, and the proximity of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Am J Pathol* **152**(2): 533-546.

Farb, A, Burke, AP, Tang, AL, Liang, TY, Mannan, P, Smialek, J, Virmani, R (1996) Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation* **93**(7): 1354-1363.

Farhat, MY, Vargas, R, Dingaen, B, Ramwell, PW (1992) In vitro effect of oestradiol on thymidine uptake in pulmonary vascular smooth muscle cell: role of the endothelium. *Br J Pharmacol* **107**(3): 679-683.

Farre, D, Roset, R, Huerta, M, Adsuara, JE, Rosello, L, Alba, MM, Messeguer, X (2003) Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3651-3653.

Felton, CV, Crook, D, Davies, MJ, Oliver, MF (1997) Relation of plaque lipid composition and morphology to the stability of human aortic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(7): 1337-1345.

Fenton, JW, 2nd, Olson, TA, Zabinski, MP, Wilner, GD (1988) Anion-binding exosite of human alpha-thrombin and fibrin(ogen) recognition. *Biochemistry* **27**(18): 7106-7112.

Fieber, C, Baumann, P, Vallon, R, Termeer, C, Simon, JC, Hofmann, M, Angel, P, Herrlich, P, Sleeman, JP (2004) Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloproteases. *J Cell Sci* **117**(Pt 2): 359-367.

Fischer, JW, Schrör, K (2007) Regulation of hyaluronan synthesis by vasodilatory prostaglandins. Implications for atherosclerosis. *Thromb Haemost* **98**(2): 287-295.

Frazier, WA (1987) Thrombospondin: a modular adhesive glycoprotein of platelets and nucleated cells. *J Cell Biol* **105**(2): 625-632.

Fujita, Y, Kitagawa, M, Nakamura, S, Azuma, K, Ishii, G, Higashi, M, Kishi, H, Hiwasa, T, Koda, K, Nakajima, N, Harigaya, K (2002) CD44 signaling through focal adhesion kinase and its anti-apoptotic effect. *FEBS Lett* **528**(1-3): 101-108.

Fuster, V, Moreno, PR, Fayad, ZA, Corti, R, Badimon, JJ (2005) Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol* **46**(6): 937-954.

Galis, ZS, Sukhova, GK, Lark, MW, Libby, P (1994) Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* **94**(6): 2493-2503.

Garcia-Cardena, G, Oh, P, Liu, J, Schnitzer, JE, Sessa, WC (1996) Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13): 6448-6453.

Gawaz, M, Langer, H, May, AE (2005) Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* **115**(12): 3378-3384.

Geary, RL, Nikkari, ST, Wagner, WD, Williams, JK, Adams, MR, Dean, RH (1998) Wound healing: a paradigm for lumen narrowing after arterial reconstruction. *J Vasc Surg* **27**(1): 96-106; discussion 106-108.

Gelfand, MM, Ferenczy, A (1989) A prospective 1-year study of estrogen and progestin in postmenopausal women: effects on the endometrium. *Obstet Gynecol* **74**(3 Pt 1): 398-402.

Glass, CK, Witztum, JL (2001) Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* **104**(4): 503-516.

Goldstein, S, Czapski, G (1995) The reaction of NO. with O₂.- and HO₂.: a pulse radiolysis study. *Free Radic Biol Med* **19**(4): 505-510.

Gomes, MP, Deitcher, SR (2004) Risk of venous thromboembolic disease associated with hormonal contraceptives and hormone replacement therapy: a clinical review. *Arch Intern Med* **164**(18): 1965-1976.

Gopala Krishnan, V, Arunakaran, J, Govindarajulu, P, Srinivasan, N (2003) Effects of estradiol and progesterone on vertebral collagen, glycosaminoglycans and phosphatases in ovariectomized adult rats. *Horm Metab Res* **35**(3): 137-141.

Gospodarowicz, D, Greenburg, G, Birdwell, CR (1978) Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correlation with the control of cellular growth. *Cancer Res* **38**(11 Pt 2): 4155-4171.

Grady, D, Rubin, SM, Petitti, DB, Fox, CS, Black, D, Ettinger, B, Ernster, VL, Cummings, SR (1992) Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med* **117**(12): 1016-1037.

Griendling, KK, Alexander, RW (1997) Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* **96**(10): 3264-3265.

Grodstein, F, Clarkson, TB, Manson, JE (2003) Understanding the divergent data on postmenopausal hormone therapy. *N Engl J Med* **348**(7): 645-650.

Grodstein, F, Stampfer, M (1995) The epidemiology of coronary heart disease and estrogen replacement in postmenopausal women. *Prog Cardiovasc Dis* **38**(3): 199-210.

Grotendorst, GR, Chang, T, Seppa, HE, Kleinman, HK, Martin, GR (1982) Platelet-derived growth factor is a chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* **113**(2): 261-266.

Grotendorst, GR, Seppa, HE, Kleinman, HK, Martin, GR (1981) Attachment of smooth muscle cells to collagen and their migration toward platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(6): 3669-3672.

Guo, X, Razandi, M, Pedram, A, Kassab, G, Levin, ER (2005) Estrogen induces vascular wall dilation: mediation through kinase signaling to nitric oxide and estrogen receptors alpha and beta. *J Biol Chem* **280**(20): 19704-19710.

Hamilton, KL, Mbai, FN, Gupta, S, Knowlton, AA (2004) Estrogen, heat shock proteins, and NFkappaB in human vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(9): 1628-1633.

Hammond, CB, Jelovsek, FR, Lee, KL, Creasman, WT, Parker, RT (1979) Effects of long-term estrogen replacement therapy. I. Metabolic effects. *Am J Obstet Gynecol* **133**(5): 525-536.

Hanke, H, Hanke, S, Bruck, B, Brehme, U, Gugel, N, Finking, G, Muck, AO, Schmahl, FW, Hombach, V, Haasis, R (1996) Inhibition of the protective effect of estrogen by progesterone in experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* **121**(1): 129-138.

Hart, CE, Forstrom, JW, Kelly, JD, Seifert, RA, Smith, RA, Ross, R, Murray, MJ, Bowen-Pope, DF (1988) Two classes of PDGF receptor recognize different isoforms of PDGF. *Science* **240**(4858): 1529-1531.

Helin, P, Lorenzen, I, Garbarsch, C, Matthiessen, ME (1971) Repair in arterial tissue. Morphological and biochemical changes in rabbit aorta after a single dilatation injury. *Circ Res* **29**(5): 542-554.

Herkert, O, Kuhl, H, Sandow, J, Busse, R, Schini-Kerth, VB (2001) Sex steroids used in hormonal treatment increase vascular procoagulant activity by inducing thrombin receptor (PAR-1) expression: role of the glucocorticoid receptor. *Circulation* **104**(23): 2826-2831.

Herzenberg, LA, Sweet, RG (1976) Fluorescence-activated cell sorting. *Sci Am* **234**(3): 108-117.

Hodgin, JB, Maeda, N (2002) Minireview: estrogen and mouse models of atherosclerosis. *Endocrinology* **143**(12): 4495-4501.

Hoibraaten, E, Abdelnoor, M, Sandset, PM (1999) Hormone replacement therapy with estradiol and risk of venous thromboembolism--a population-based case-control study. *Thromb Haemost* **82**(4): 1218-1221.

Hoibraaten, E, Os, I, Seljeflot, I, Andersen, TO, Hofstad, A, Sandset, PM (2000) The effects of hormone replacement therapy on hemostatic variables in women with angiographically verified coronary artery disease: results from the estrogen in women with atherosclerosis study. *Thromb Res* **98**(1): 19-27.

Hook, M, Kjellen, L, Johansson, S (1984) Cell-surface glycosaminoglycans. *Annu Rev Biochem* **53**: 847-869.

Hulley, S, Grady, D, Bush, T, Furberg, C, Herrington, D, Riggs, B, Vittinghoff, E (1998) Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* **280**(7): 605-613.

Ignarro, LJ, Cirino, G, Casini, A, Napoli, C (1999) Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* **34**(6): 879-886.

Itano, N, Sawai, T, Yoshida, M, Lenas, P, Yamada, Y, Imagawa, M, Shinomura, T, Hamaguchi, M, Yoshida, Y, Ohnuki, Y, Miyauchi, S, Spicer, AP, McDonald, JA, Kimata, K (1999) Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem* **274**(35): 25085-25092.

Jain, M, He, Q, Lee, WS, Kashiki, S, Foster, LC, Tsai, JC, Lee, ME, Haber, E (1996) Role of CD44 in the reaction of vascular smooth muscle cells to arterial wall injury. *J Clin Invest* **97**(3): 596-603.

Jarrar, D, Wang, P, Cioffi, WG, Bland, KI, Chaudry, IH (2000a) The female reproductive cycle is an important variable in the response to trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**(3): H1015-1021.

Jarrar, D, Wang, P, Knoferl, MW, Kuebler, JF, Cioffi, WG, Bland, KI, Chaudry, IH (2000b) Insight into the mechanism by which estradiol improves organ functions after trauma-hemorrhage. *Surgery* **128**(2): 246-252.

Jiang, F, Gibson, AP, Dusting, GJ (2001) Endothelial dysfunction induced by oxidized low-density lipoproteins in isolated mouse aorta: a comparison with apolipoprotein-E deficient mice. *Eur J Pharmacol* **424**(2): 141-149.

Kalu, DN, Liu, CC, Salerno, E, Hollis, B, Echon, R, Ray, M (1991) Skeletal response of ovariectomized rats to low and high doses of 17 beta-estradiol. *Bone Miner* **14**(3): 175-187.

Kannel, WB (2000) Fifty years of Framingham Study contributions to understanding hypertension. *J Hum Hypertens* **14**(2): 83-90.

Kaplan, AP (1978) Initiation of the intrinsic coagulation and fibrinolytic pathways of man: the role of surfaces, hageman factor, prekallikrein, high molecular weight kininogen, and factor XI. *Prog Hemost Thromb* **4**: 127-175.

Kappert, K, Caglayan, E, Huntgeburth, M, Baumer, AT, Sparwel, J, Uebel, M, Rosenkranz, S (2006) 17Beta-estradiol attenuates PDGF signaling in vascular smooth muscle cells at the postreceptor level. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**(2): H538-546.

Kavanagh, K, Davis, MA, Zhang, L, Wilson, MD, Register, TC, Adams, MR, Rudel, LL, Wagner, JD (2009) Estrogen decreases atherosclerosis in part by reducing hepatic acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2) in monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(10): 1471-1477.

Kazi, AA, Koos, RD (2007) Estrogen-induced activation of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor expression, and edema in the uterus are mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Endocrinology* **148**(5): 2363-2374.

Keyes, LE, Moore, LG, Walchak, SJ, Dempsey, EC (1996) Pregnancy-stimulated growth of vascular smooth muscle cells: importance of protein kinase C-dependent synergy between estrogen and platelet-derived growth factor. *J Cell Physiol* **166**(1): 22-32.

Koda, JE, Bernfield, M (1984) Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. Basal extracellular proteoglycan binds specifically to native type I collagen fibrils. *J Biol Chem* **259**(19): 11763-11770.

Kojda, G, Harrison, D (1999) Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* **43**(3): 562-571.

Kojda, G, Patzner, M, Hacker, A, Noack, E (1998) Nitric oxide inhibits vascular bioactivation of glyceryl trinitrate: a novel mechanism to explain preferential venodilation of organic nitrates. *Mol Pharmacol* **53**(3): 547-554.

Kojda, G, Hafner, D, Behne, M, Wilhelm, M (2002) Pharmakologie Toxikologie Systematisch. 2 ed. Bremen, London, Boston, UNI-Med AG

Kolodgie, FD, Burke, AP, Farb, A, Weber, DK, Kutys, R, Wight, TN, Virmani, R (2002) Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**(10): 1642-1648.

Kolodgie, FD, Katocs, AS, Jr., Largis, EE, Wrenn, SM, Cornhill, JF, Herderick, EE, Lee, SJ, Virmani, R (1996) Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. Methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**(12): 1454-1464.

Koubovec, D, Berghe, WV, Vermeulen, L, Haegeman, G, Hapgood, JP (2004) Medroxyprogesterone acetate downregulates cytokine gene expression in mouse fibroblast cells. *Mol Cell Endocrinol* **221**(1-2): 75-85.

Koyama, N, Morisaki, N, Saito, Y, Yoshida, S (1992) Regulatory effects of platelet-derived growth factor-AA homodimer on migration of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **267**(32): 22806-22812.

Kubes, P, Suzuki, M, Granger, DN (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(11): 4651-4655.

Kuhl, H (1996) Effects of progestogens on haemostasis. *Maturitas* **24**(1-2): 1-19.

Kurz, KD, Main, BW, Sandusky, GE (1990) Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res* **60**(4): 269-280.

Kuzkaya, N, Weissmann, N, Harrison, DG, Dikalov, S (2003) Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **278**(25): 22546-22554.

Kyhse-Andersen, J (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**(3-4): 203-209.

Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.

Lattera, J, Ansbacher, R, Culp, LA (1980) Glycosaminoglycans that bind cold-insoluble globulin in cell-substratum adhesion sites of murine fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(11): 6662-6666.

Lattera, J, Silbert, JE, Culp, LA (1983) Cell surface heparan sulfate mediates some adhesive responses to glycosaminoglycan-binding matrices, including fibronectin. *J Cell Biol* **96**(1): 112-123.

Laurie, GW, Bing, JT, Kleinman, HK, Hassell, JR, Aumailley, M, Martin, GR, Feldmann, RJ (1986) Localization of binding sites for laminin, heparan sulfate proteoglycan and fibronectin on basement membrane (type IV) collagen. *J Mol Biol* **189**(1): 205-216.

Lee, RT, Libby, P (1997) The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(10): 1859-1867.

Lee, TH, Wisniewski, HG, Vilcek, J (1992) A novel secretory tumor necrosis factor-inducible protein (TSG-6) is a member of the family of hyaluronate binding proteins, closely related to the adhesion receptor CD44. *J Cell Biol* **116**(2): 545-557.

Lerman, A, Zeiher, AM (2005) Endothelial function: cardiac events. *Circulation* **111**(3): 363-368.

Levesque, H, Girard, N, Maingonnat, C, Delpech, A, Chauzy, C, Tayot, J, Courtois, H, Delpech, B (1994) Localization and solubilization of hyaluronan and of the hyaluronan-binding protein hyaluronectin in human normal and arteriosclerotic arterial walls. *Atherosclerosis* **105**(1): 51-62.

Lin, AL, Gonzalez, R, Jr., Carey, KD, Shain, SA (1986a) Estradiol-17 beta affects estrogen receptor distribution and elevates progesterone receptor content in baboon aorta. *Arteriosclerosis* **6**(5): 495-504.

Lin, AL, McGill, HC, Jr., Shain, SA (1982) Hormone receptors of the baboon cardiovascular system. Biochemical characterization of aortic and myocardial cytoplasmic progesterone receptors. *Circ Res* **50**(5): 610-616.

Lin, AL, Shain, SA (1986b) Sexual dimorphism characterizes steroid hormone modulation of rat aortic steroid hormone receptors. *Endocrinology* **119**(1): 296-302.

Ling, S, Dai, A, Dilley, RJ, Jones, M, Simpson, E, Komesaroff, PA, Sudhir, K (2004) Endogenous estrogen deficiency reduces proliferation and enhances apoptosis-related death in vascular smooth muscle cells: insights from the aromatase-knockout mouse. *Circulation* **109**(4): 537-543.

Lobo, RA, Bush, T, Carr, BR, Pickar, JH (2001) Effects of lower doses of conjugated equine estrogens and medroxyprogesterone acetate on plasma lipids and lipoproteins, coagulation factors, and carbohydrate metabolism. *Fertil Steril* **76**(1): 13-24.

Lokeshwar, VB, Selzer, MG (2000) Differences in hyaluronic acid-mediated functions and signaling in arterial, microvessel, and vein-derived human endothelial cells. *J Biol Chem* **275**(36): 27641-27649.

Lottspeich, F, Zorbas, H (1998) Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Malakoff, D (2000) The rise of the mouse, biomedicine's model mammal. *Science* **288**(5464): 248-253.

Mann, KG (1999) Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost* **82**(2): 165-174.

Mann, KG, Nesheim, ME, Church, WR, Haley, P, Krishnaswamy, S (1990) Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood* **76**(1): 1-16.

Margolis, RU, Margolis, RK (1994) Aggrecan-versican-neurocan family proteoglycans. *Methods Enzymol* **245**: 105-126.

Marsh, MM, Walker, VR, Curtiss, LK, Banka, CL (1999) Protection against atherosclerosis by estrogen is independent of plasma cholesterol levels in LDL receptor-deficient mice. *J Lipid Res* **40**(5): 893-900.

Marzoll, A, Melchior-Becker, A, Cipollone, F, Fischer, JW (2009a) Small leucine-rich proteoglycans in atherosclerotic lesions: Novel targets of chronic statin treatment? *J Cell Mol Med*.

Marzoll, A, Nagy, N, Wordehoff, L, Dai, G, Fries, S, Lindner, V, Grosser, T, Fischer, JW (2009b) Cyclooxygenase inhibitors repress vascular hyaluronan-synthesis in murine atherosclerosis and neointimal thickening. *J Cell Mol Med* **13**(9B): 3713-3719.

McFarlane, AS, Todd, D, Cromwell, S (1964) Fibrinogen Catabolism in Humans. *Clin Sci* **26**: 415-420.

Mendelsohn, ME, Karas, RH (1999) The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* **340**(23): 1801-1811.

Messeguer, X, Escudero, R, Farre, D, Nunez, O, Martinez, J, Alba, MM (2002) PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* **18**(2): 333-334.

Meyer, K, Palmer, JW (1934) The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry* **107**: 629-634.

Meyer-Kirchrath, J, Debey, S, Glandorff, C, Kirchrath, L, Schror, K (2004) Gene expression profile of the Gs-coupled prostacyclin receptor in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* **67**(4): 757-765.

Mittal, CK, Murad F (1982) Guanylate cyclase: Regulation of cyclic GMP metabolism. *In*: J.A. Nathanson, J.W. Kebabian, editors. Cyclic Nucleotides I. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1982: 225-260

Miyagawa, K, Rosch, J, Stanczyk, F, Hermsmeyer, K (1997) Medroxyprogesterone interferes with ovarian steroid protection against coronary vasospasm. *Nat Med* **3**(3): 324-327.

Mohamadzadeh, M, DeGrendele, H, Arizpe, H, Estess, P, Siegelman, M (1998) Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA-dependent primary adhesion. *J Clin Invest* **101**(1): 97-108.

Mohapatra, S, Yang, X, Wright, JA, Turley, EA, Greenberg, AH (1996) Soluble hyaluronan receptor RHAMM induces mitotic arrest by suppressing Cdc2 and cyclin B1 expression. *J Exp Med* **183**(4): 1663-1668.

Montague, CR, Hunter, MG, Gavrilin, MA, Phillips, GS, Goldschmidt-Clermont, PJ, Marsh, CB (2006) Activation of estrogen receptor-alpha reduces aortic smooth muscle differentiation. *Circ Res* **99**(5): 477-484.

Morel, DR, Lowenstein, E, Nguyenduy, T, Robinson, DR, Repine, JE, Chenoweth, DE, Zapol, WM (1988) Acute pulmonary vasoconstriction and thromboxane release during protamine reversal of heparin anticoagulation in awake sheep. Evidence for the role of reactive oxygen metabolites following nonimmunological complement activation. *Circ Res* **62**(5): 905-915.

Moreno, PR, Bernardi, VH, Lopez-Cuellar, J, Murcia, AM, Palacios, IF, Gold, HK, Mehran, R, Sharma, SK, Nemerson, Y, Fuster, V, Fallon, JT (1996) Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation* **94**(12): 3090-3097.

Moreno, PR, Falk, E, Palacios, IF, Newell, JB, Fuster, V, Fallon, JT (1994) Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation* **90**(2): 775-778.

Mori-Abe, A, Tsutsumi, S, Takahashi, K, Toya, M, Yoshida, M, Du, B, Kawagoe, J, Nakahara, K, Takahashi, T, Ohmichi, M, Kurachi, H (2003) Estrogen and raloxifene induce apoptosis by activating p38 mitogen-activated protein kinase cascade in synthetic vascular smooth muscle cells. *J Endocrinol* **178**(3): 417-426.

Munzel, T, Mollnau, H, Hartmann, M, Geiger, C, Oelze, M, Warnholtz, A, Yehia, AH, Forstermann, U, Meinertz, T (2000) Effects of a nitrate-free interval on tolerance, vasoconstrictor sensitivity and vascular superoxide production. *J Am Coll Cardiol* **36**(2): 628-634.

Murad, F (1996) The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. Signal transduction using nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. *JAMA* **276**(14): 1189-1192.

Nagy, N, Melchior-Becker, A, Fischer, JW Long-term treatment with the AT1-receptor antagonist telmisartan inhibits biglycan accumulation in murine atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* **105**(1): 29-38.

Nandi, A, Estess, P, Siegelman, MH (2000) Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. *J Biol Chem* **275**(20): 14939-14948.

Napoli, C, D'Armiento, FP, Mancini, FP, Postiglione, A, Witztum, JL, Palumbo, G, Palinski, W (1997) Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* **100**(11): 2680-2690.

Navab, M, Berliner, JA, Watson, AD, Hama, SY, Territo, MC, Lusis, AJ, Shih, DM, Van Lenten, BJ, Frank, JS, Demer, LL, Edwards, PA, Fogelman, AM (1996) The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**(7): 831-842.

Nemerson, Y (1988) Tissue factor and hemostasis. *Blood* **71**(1): 1-8.

Newby, AC, Zaltsman, AB (1999) Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res* **41**(2): 345-360.

Nikkari, ST, Jarvelainen, HT, Wight, TN, Ferguson, M, Clowes, AW (1994) Smooth muscle cell expression of extracellular matrix genes after arterial injury. *Am J Pathol* **144**(6): 1348-1356.

Nozaki, M, Ogata, R, Koera, K, Hashimoto, K, Nakano, H (1999) Changes in coagulation factors and fibrinolytic components of postmenopausal women receiving continuous hormone replacement therapy. *Climacteric* **2**(2): 124-130.

Oppermann M (2006) Arzneimittel mit NO-Wirkung. Vasodilatation bis Vasoprotektion. *Apothekenmagazin* **24**(03): 40-48

Orimo, A, Inoue, S, Ikegami, A, Hosoi, T, Akishita, M, Ouchi, Y, Muramatsu, M, Orimo, H (1993) Vascular smooth muscle cells as target for estrogen. *Biochem Biophys Res Commun* **195**(2): 730-736.

Palmer, RM, Ashton, DS, Moncada, S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**(6174): 664-666.

Pardue, EL, Ibrahim, S, Ramamurthi, A (2008) Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenic tissue engineering. *Organogenesis* **4**(4): 203-214.

Pasquali-Ronchetti, I, Quaglino, D, Mori, G, Bacchelli, B, Ghosh, P (1997) Hyaluronan-phospholipid interactions. *J Struct Biol* **120**(1): 1-10.

Paterson, ME, Wade-Evans, T, Sturdee, DW, Thom, MH, Studd, JW (1980) Endometrial disease after treatment with oestrogens and progestogens in the climacteric. *Br Med J* **280**(6217): 822-824.

Paulsson, G, Zhou, X, Tornquist, E, Hansson, GK (2000) Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(1): 10-17.

Penckofer, SM, Hackbarth, D, Schwartz, DW (2003) Estrogen plus progestin therapy: the cardiovascular risks exceed the benefits. *J Cardiovasc Nurs* **18**(5): 347-355.

Persson, I, Adami, HO, Bergkvist, L, Lindgren, A, Pettersson, B, Hoover, R, Schairer, C (1989) Risk of endometrial cancer after treatment with oestrogens alone or in conjunction with progestogens: results of a prospective study. *BMJ* **298**(6667): 147-151.

Piedrahita, JA, Zhang, SH, Hagaman, JR, Oliver, PM, Maeda, N (1992) Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(10): 4471-4475.

Pike, MC, Peters, RK, Cozen, W, Probst-Hensch, NM, Felix, JC, Wan, PC, Mack, TM (1997) Estrogen-progestin replacement therapy and endometrial cancer. *J Natl Cancer Inst* **89**(15): 1110-1116.

Plenz, GA, Deng, MC, Robenek, H, Volker, W (2003) Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. *Atherosclerosis* **166**(1): 1-11.

Plump, AS, Smith, JD, Hayek, T, Aalto-Setälä, K, Walsh, A, Verstuyft, JG, Rubin, EM, Breslow, JL (1992) Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* **71**(2): 343-353.

Plutzky, J (1999) Atherosclerotic plaque rupture: emerging insights and opportunities. *Am J Cardiol* **84**(1A): 15J-20J.

Poulin, R, Baker, D, Poirier, D, Labrie, F (1989) Androgen and glucocorticoid receptor-mediated inhibition of cell proliferation by medroxyprogesterone acetate in ZR-75-1 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **13**(2): 161-172.

Poulin, R, Baker, D, Poirier, D, Labrie, F (1991) Multiple actions of synthetic 'progestins' on the growth of ZR-75-1 human breast cancer cells: an in vitro model for the simultaneous assay of androgen, progestin, estrogen, and glucocorticoid agonistic and antagonistic activities of steroids. *Breast Cancer Res Treat* **17**(3): 197-210.

Powell, JD, Horton, MR (2005) Threat matrix: low-molecular-weight hyaluronan (HA) as a danger signal. *Immunol Res* **31**(3): 207-218.

Prehm, P (2006) Biosynthesis of hyaluronan: direction of chain elongation. *Biochem J* **398**(3): 469-473.

Prehm, P (1984) Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. *Biochem J* **220**(2): 597-600.

Pries, AR, Secomb, TW, Gaehtgens, P (2000) The endothelial surface layer. *Pflugers Arch* **440**(5): 653-666.

Raines, EW, Ross, R (1996) Multiple growth factors are associated with lesions of atherosclerosis: specificity or redundancy? *Bioessays* **18**(4): 271-282.

Rauch, U, Osende, JI, Fuster, V, Badimon, JJ, Fayad, Z, Chesebro, JH (2001) Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med* **134**(3): 224-238.

Recalcatti, S, Taramelli, D, Conte, D, Cairo, G (1998) Nitric oxide-mediated induction of ferritin synthesis in J774 macrophages by inflammatory cytokines: role of selective iron regulatory protein-2 downregulation. *Blood* **91**(3): 1059-1066.

Reimann-Hunziker, G (1944) Über experimentelle Thrombose und ihre Behandlung mit Heparin. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* **74**:66-69

Riessen, R, Wight, TN, Pastore, C, Henley, C, Isner, JM (1996) Distribution of hyaluronan during extracellular matrix remodeling in human restenotic arteries and balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation* **93**(6): 1141-1147.

Rosenfeld, ME, Polinsky, P, Virmani, R, Kauser, K, Rubanyi, G, Schwartz, SM (2000) Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(12): 2587-2592.

Rosenkranz, S, Kazlauskas, A (1999) Evidence for distinct signaling properties and biological responses induced by the PDGF receptor alpha and beta subtypes. *Growth Factors* **16**(3): 201-216.

Ross, R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**(2): 115-126.

Ross, R (1981) George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. *Arteriosclerosis* **1**(5): 293-311.

Ross, R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**(6423): 801-809.

Ross, R, Glomset, JA (1973) Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* **180**(93): 1332-1339.

Ross, R, Raines, EW, Bowen-Pope, DF (1986) The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* **46**(2): 155-169.

Rossouw, JE, Anderson, GL, Prentice, RL, LaCroix, AZ, Kooperberg, C, Stefanick, ML, Jackson, RD, Beresford, SA, Howard, BV, Johnson, KC, Kotchen, JM, Ockene, J (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* **288**(3): 321-333.

Rossouw, JE, Prentice, RL, Manson, JE, Wu, L, Barad, D, Barnabei, VM, Ko, M, LaCroix, AZ, Margolis, KL, Stefanick, ML (2007) Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA* **297**(13): 1465-1477.

Sakashita, S, Engvall, E, Ruoslahti, E (1980) Basement membrane glycoprotein laminin binds to heparin. *FEBS Lett* **116**(2): 243-246.

Saunders, S, Bernfield, M (1988) Cell surface proteoglycan binds mouse mammary epithelial cells to fibronectin and behaves as a receptor for interstitial matrix. *J Cell Biol* **106**(2): 423-430.

Savani, RC, Turley, EA (1995) The role of hyaluronan and its receptors in restenosis after balloon angioplasty: development of a potential therapy. *Int J Tissue React* **17**(4): 141-151.

Scarabin, PY, Alhenc-Gelas, M, Plu-Bureau, G, Taisne, P, Agher, R, Aiach, M (1997) Effects of oral and transdermal estrogen/progesterone regimens on blood coagulation and fibrinolysis in postmenopausal women. A randomized controlled trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(11): 3071-3078.

Schmaier, AH, Rojkaer, R, Shariat-Madar, Z (1999) Activation of the plasma kallikrein/kinin system on cells: a revised hypothesis. *Thromb Haemost* **82**(2): 226-233.

Schoenfelder, M, Einspanier, R (2003) Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. *Biol Reprod* **69**(1): 269-277.

Schousboe, I (1993) Contact activation in human plasma is triggered by zinc ion modulation of factor XII (Hageman factor). *Blood Coagul Fibrinolysis* **4**(5): 671-678.

Schultz, K, Schultz, G (1977) Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature* **265**(5596): 750-751.

Scott-Burden, T, Vanhoutte PM (1993) The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation* **87**(Suppl. 5): V51-V55

Shah, PK, Falk, E, Badimon, JJ, Fernandez-Ortiz, A, Mailhac, A, Villareal-Levy, G, Fallon, JT, Regnstrom, J, Fuster, V (1995) Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* **92**(6): 1565-1569.

Shah, PK, Galis, ZS (2001) Matrix metalloproteinase hypothesis of plaque rupture: players keep piling up but questions remain. *Circulation* **104**(16): 1878-1880.

Shirasaki, Y, Su, C (1985) Endothelium removal augments vasodilation by sodium nitroprusside and sodium nitrite. *Eur J Pharmacol* **114**(1): 93-96.

Shore, JD, Day, DE, Bock, PE, Olson, ST (1987) Acceleration of surface-dependent autocatalytic activation of blood coagulation factor XII by divalent metal ions. *Biochemistry* **26**(8): 2250-2258.

Shultz, JM, Zhu, XD, Knopp, RH, Leboeuf, RC, Rosenfeld, ME (2004) Norgestimate and medroxyprogesterone acetate do not attenuate the atheroprotective effects of 17beta-estradiol in ovariectomized, apolipoprotein E-deficient mice. *Fertil Steril* **82** Suppl 3: 1133-1139.

Siegelman, MH, DeGrendele, HC, Estess, P (1999) Activation and interaction of CD44 and hyaluronan in immunological systems. *J Leukoc Biol* **66**(2): 315-321.

Silverberg, M, Nicoll, JE, Kaplan, AP (1980) The mechanism by which the light chain of cleaved HMW-kininogen augments the activation of prekallikrein, factor XI and Hageman factor. *Thromb Res* **20**(2): 173-189.

Somjen, D, Kohen, F, Jaffe, A, Amir-Zaltsman, Y, Knoll, E, Stern, N (1998) Effects of gonadal steroids and their antagonists on DNA synthesis in human vascular cells. *Hypertension* **32**(1): 39-45.

Song, J, Wan, Y, Rolfe, BE, Campbell, JH, Campbell, GR (1998) Effect of estrogen on vascular smooth muscle cells is dependent upon cellular phenotype. *Atherosclerosis* **140**(1): 97-104.

Sporn, LA, and Huber, P (2001). Endothelial cell biology. In: R.W. Colman, J. Hirsh, V.J. Marder, A.W. Clowes & J.N. George (Eds.), Hemostasis and Thrombosis. Basic principles and clinical practice, Fourth Edition, Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins, 615-623

Stary, HC, Chandler, AB, Glagov, S, Guyton, JR, Insull, W, Jr., Rosenfeld, ME, Schaffer, SA, Schwartz, CJ, Wagner, WD, Wissler, RW (1994) A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* **89**(5): 2462-2478.

Stern, R, Asari, AA, Sugahara, KN (2006a) Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol* **85**(8): 699-715.

Stern, R, Jedrzejewski, MJ (2006b) Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev* **106**(3): 818-839.

Stice, JP, Knowlton, AA (2008) Estrogen, NFkappaB, and the heat shock response. *Mol Med* **14**(7-8): 517-527.

Stumpf, WE, Sar, M, Aumuller, G (1977) The heart: a target organ for estradiol. *Science* **196**(4287): 319-321.

Sumino, H, Ichikawa, S, Sawada, Y, Sakamoto, H, Kumakura, H, Takayama, Y, Sakamaki, T, Kurabayashi, M (2005) Effects of hormone replacement therapy on blood coagulation and fibrinolysis in hypertensive and normotensive postmenopausal women. *Thromb Res* **115**(5): 359-366.

Sussmann, M, Sarbia, M, Meyer-Kirchrath, J, Nusing, RM, Schror, K, Fischer, JW (2004) Induction of hyaluronic acid synthase 2 (HAS2) in human vascular smooth muscle cells by vasodilatory prostaglandins. *Circ Res* **94**(5): 592-600.

Suzuki, A, Mizuno, K, Ino, Y, Okada, M, Kikkawa, F, Mizutani, S, Tomoda, Y (1996) Effects of 17 beta-estradiol and progesterone on growth-factor-induced proliferation and migration in human female aortic smooth muscle cells in vitro. *Cardiovasc Res* **32**(3): 516-523.

Takahashi, K, Ohmichi, M, Yoshida, M, Hisamoto, K, Mabuchi, S, Arimoto-Ishida, E, Mori, A, Tsutsumi, S, Tasaka, K, Murata, Y, Kurachi, H (2003) Both estrogen and raloxifene cause G1 arrest of vascular smooth muscle cells. *J Endocrinol* **178**(2): 319-329.

Tanaka, K, Nakamura, T, Takagaki, K, Funahashi, M, Saito, Y, Endo, M (1997) Regulation of hyaluronate metabolism by progesterone in cultured fibroblasts from the human uterine cervix. *FEBS Lett* **402**(2-3): 223-226.

Thom, T, Haase, N, Rosamond, W, Howard, VJ, Rumsfeld, J, Manolio, T, Zheng, ZJ, Flegal, K, O'Donnell, C, Kittner, S, Lloyd-Jones, D, Goff, DC, Jr., Hong, Y, Adams, R, Friday, G, Furie, K, Gorelick, P, Kissela, B, Marler, J, Meigs, J, Roger, V, Sidney, S, Sorlie, P, Steinberger, J, Wasserthiel-Smoller, S, Wilson, M, Wolf, P (2006) Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart

Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* **113**(6): e85-151.

Thompson, RE, Mandle, R, Jr., Kaplan, AP (1979) Studies of binding of prekallikrein and Factor XI to high molecular weight kininogen and its light chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(10): 4862-4866.

Toole, BP, Wight, TN, Tammi, MI (2002) Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. *J Biol Chem* **277**(7): 4593-4596.

Uzuka, M, Nakajima, K, Ohta, S, Mori, Y (1981) Induction of hyaluronic acid synthetase by estrogen in the mouse skin. *Biochim Biophys Acta* **673**(4): 387-393.

van den Boom, M, Sarbia, M, von Wnuck Lipinski, K, Mann, P, Meyer-Kirchrath, J, Rauch, BH, Grabitz, K, Levkau, B, Schror, K, Fischer, JW (2006) Differential regulation of hyaluronic acid synthase isoforms in human saphenous vein smooth muscle cells: possible implications for vein graft stenosis. *Circ Res* **98**(1): 36-44.

Vandeplassche, G, Bernier, M, Thone, F, Borgers, M, Kusama, Y, Hearse, DJ (1990) Singlet oxygen and myocardial injury: ultrastructural, cytochemical and electrocardiographic consequences of photoactivation of rose bengal. *J Mol Cell Cardiol* **22**(3): 287-301.

Vargas, R, Wroblewska, B, Rego, A, Hatch, J, Ramwell, PW (1993) Oestradiol inhibits smooth muscle cell proliferation of pig coronary artery. *Br J Pharmacol* **109**(3): 612-617.

Vickers, MR, MacLennan, AH, Lawton, B, Ford, D, Martin, J, Meredith, SK, DeStavola, BL, Rose, S, Dowell, A, Wilkes, HC, Darbyshire, JH, Meade, TW (2007) Main morbidities recorded in the women's international study of long duration oestrogen after menopause (WISDOM): a randomised controlled trial of hormone replacement therapy in postmenopausal women. *BMJ* **335**(7613): 239.

Vigetti, D, Genasetti, A, Karousou, E, Viola, M, Clerici, M, Bartolini, B, Moretto, P, De Luca, G, Hascall, VC, Passi, A (2009) Modulation of hyaluronan synthase activity in cellular membrane fractions. *J Biol Chem* **284**(44): 30684-30694.

Virmani, R, Kolodgie, FD, Burke, AP, Farb, A, Schwartz, SM (2000) Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(5): 1262-1275.

Voigt, LF, Weiss, NS, Chu, J, Daling, JR, McKnight, B, van Belle, G (1991) Progestagen supplementation of exogenous oestrogens and risk of endometrial cancer. *Lancet* **338**(8762): 274-277.

Wakatsuki, A, Okatani, Y, Ikenoue, N, Fukaya, T (2002) Effect of medroxyprogesterone acetate on vascular inflammatory markers in postmenopausal women receiving estrogen. *Circulation* **105**(12): 1436-1439.

Wang, YX (2005) Cardiovascular functional phenotypes and pharmacological responses in apolipoprotein E deficient mice. *Neurobiol Aging* **26**(3): 309-316.

Wassmann, K, Wassmann, S, Nickenig, G (2005) Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. *Circ Res* **97**(10): 1046-1054.

Wassmann, S, Czech, T, van Eickels, M, Fleming, I, Bohm, M, Nickenig, G (2004) Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice. *Circulation* **110**(19): 3062-3067.

Westerlind, KC, Wakley, GK, Evans, GL, Turner, RT (1993) Estrogen does not increase bone formation in growing rats. *Endocrinology* **133**(6): 2924-2934.

Westrick, RJ, Winn, ME, Eitzman, DT (2007) Murine models of vascular thrombosis (Eitzman series). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(10): 2079-2093.

Whitehead, MI, King, RJ, McQueen, J, Campbell, S (1979) Endometrial histology and biochemistry in climacteric women during oestrogen and oestrogen/progestogen therapy. *J R Soc Med* **72**(5): 322-327.

Wiggins, RC, Cochrane, CC (1979) The autoactivation of rabbit Hageman factor. *J Exp Med* **150**(5): 1122-1133.

Wight, TN (1989) Cell biology of arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis* **9**(1): 1-20.

Wight, TN (1980) Vessel proteoglycans and thrombogenesis. *Prog Hemost Thromb* **5**: 1-39.

Wight, TN, Curwen, KD, Litrenta, MM, Alonso, DR, Minick, CR (1983) Effect of endothelium on glycosaminoglycan accumulation in injured rabbit aorta. *Am J Pathol* **113**(2): 156-164.

Wilson, CA, Hatchell, DL (1991) Photodynamic retinal vascular thrombosis. Rate and duration of vascular occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **32**(8): 2357-2365.

Wolf, D, Schumann, J, Koerber, K, Kiemer, AK, Vollmar, AM, Sass, G, Papadopoulos, T, Bang, R, Klein, SD, Brune, B, Tiegs, G (2001) Low-molecular-weight hyaluronic acid induces nuclear factor-kappaB-dependent resistance against tumor necrosis factor alpha-mediated liver injury in mice. *Hepatology* **34**(3): 535-547.

Wolf, YG, Rasmussen, LM, Ruoslahti, E (1994) Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. *J Clin Invest* **93**(3): 1172-1178.

Woodruff, JD, Pickar, JH (1994) Incidence of endometrial hyperplasia in postmenopausal women taking conjugated estrogens (Premarin) with medroxyprogesterone acetate or conjugated estrogens alone. The Menopause Study Group. *Am J Obstet Gynecol* **170**(5 Pt 1): 1213-1223.

Yamada, KM (1983) Cell surface interactions with extracellular materials. *Annu Rev Biochem* **52**: 761-799.

Yao, LY, Moody, C, Schonherr, E, Wight, TN, Sandell, LJ (1994) Identification of the proteoglycan versican in aorta and smooth muscle cells by DNA sequence analysis, in situ hybridization and immunohistochemistry. *Matrix Biol* **14**(3): 213-225.

Ye, L, Mora, R, Akhayani, N, Haudenschild, CC, Liao, G (1997) Growth factor and cytokine-regulated hyaluronan-binding protein TSG-6 is localized to the injury-induced rat neointima and confers enhanced growth in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **81**(3): 289-296.

Yoshida, T, Gan, Q, Shang, Y, Owens, GK (2007) Platelet-derived growth factor-BB represses smooth muscle cell marker genes via changes in binding of MKL factors and histone deacetylases to their promoters. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**(2): C886-895.

Zacharia, LC, Gogos, JA, Karayiorgou, M, Jackson, EK, Gillespie, DG, Barchiesi, F, Dubey, RK (2003) Methoxyestradiols mediate the antimitogenic effects of 17 β -estradiol: direct evidence from catechol-O-methyltransferase-knockout mice. *Circulation* **108**(24): 2974-2978.

Zerr-Fouineau, M, Chataigneau, M, Blot, C, Schini-Kerth, VB (2007) Progestins overcome inhibition of platelet aggregation by endothelial cells by down-regulating endothelial NO synthase via glucocorticoid receptors. *FASEB J* **21**(1): 265-273.

8. *Appendizes*

8.1 Appendix 1

Öl-Rot-O-Stammlösung (0,5 %)

0,4 g Öl-Rot-O (ad 80 ml MeOH)

Öl-Rot-O-Färbelösung

10 ml 1 M NaOH

35 ml Öl-Rot-O-Stammlösung

Picro-Sirius-Rot-Lösung

0,1 g Direct Red 80

ad 100 ml gesättigte Pikrinsäure

Celestinblau-Lösung

2,5 g Ammonium-EisenIII-sulfat über Nacht in 50 ml aqua dest. lösen

0,25 g Celestinblau zugeben, 30 min kochen und filtrieren

7 ml Glycerin zugeben

Krebs-Hepes-Puffer

NaCl 99 mM, KCl 4,69 mM, CaCl₂ 1,87 mM, MgSO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 25,0 mM, K₂HPO₄ 1,03 mM, Na-Hepes 20 mM, Glucose 11,1 mM, pH 7,4

Krebs-Henseleit-Puffer (modifiziert):

Ionenzusammensetzung:

Natrium	145,85 mM	Chlorid	127,14 mM
Kalium	5,87 mM	Hydrogencarbonat	25,00 mM
Calcium	1,60 mM	Dihydrogenphosphat	1,18 mM
Magnesium	1,18 mM	Sulfat	1,18 mM

Glucose 5,50 mM

Der Puffer wird auf einen pH-Wert von 7,05 eingestellt. Durch die Carbogenbegasung während des Organbadversuchs erhält der Puffer einen physiologischen pH-Wert von 7,4.

10x PBS

2 g KCl, 2 g KH_2PO_4 , 80 g NaCl, 11,5 g Na_2HPO_4 (ad 1 l, pH 7,4), für den Gebrauch 1:10 mit dH_2O verdünnen

10x TBS

24,2 g Tris, 80 g NaCl (ad 1 l, pH 7,6), für den Gebrauch 1:10 mit dH_2O verdünnen

1x TBST

1x TBS, 0,1 % Tween20

Zelllysis-Puffer

50 mM NaCl, 120 mM Tris (pH 6,8), 2 % SDS, 10 % Glyzerin

Auftragspuffer-Puffer (4x)

150 mM Tris, 30 % Glyzerin, 2 % SDS, frisch 7 % β -Mercaptoethanol (Sigma, Steinheim)

Laufpuffer (10x)

144 g Glycin, 30 g Tris
ad 1 l

Laufpuffer (1x)

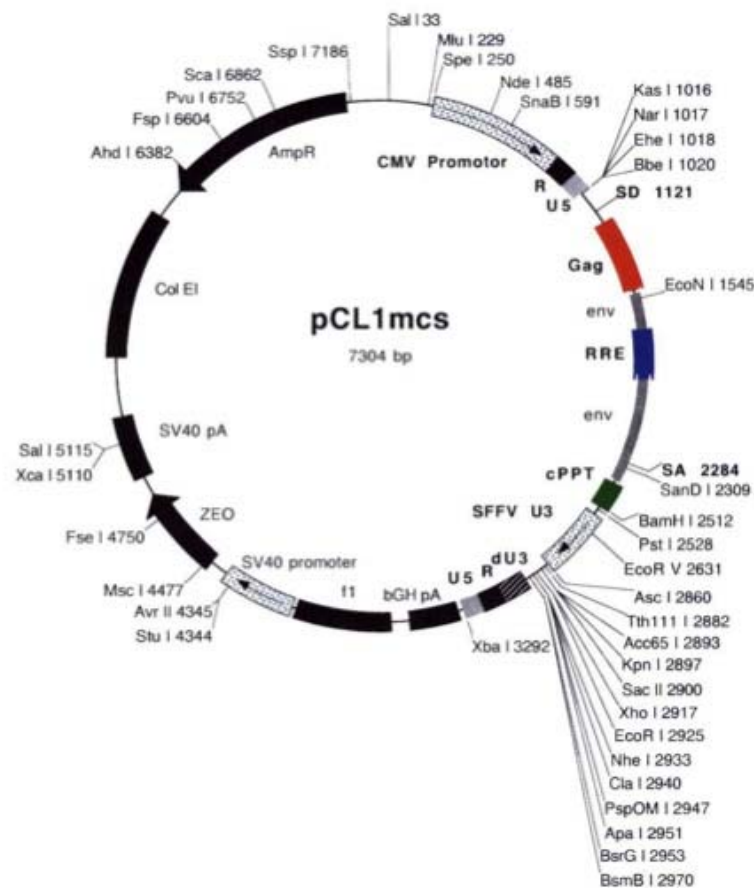
100 ml 10x Laufpuffer
10 ml 10 %-ige SDS-Lösung
ad 1 l

Transferpuffer

70 ml H_2O
20 ml Methanol (Merck, Darmstadt)
10 ml 10x Laufpuffer

8.2 Appendix 2

pCL1 Leervektor



pCL1 wurde als Transferplasmid gewählt und zugleich als Leervektor verwendet, der durch seine EGFP-Expression charakterisiert ist. Die „multiple cloning site“ (mcs) im pCL1 wurde mit XhoI und EcoRI restriktionsverdaut. Die cDNA der humanen HAS1 und HAS2 wurde durch RT-PCR aus Gesamt-RNA humaner glatter Gefäßmuskelzellen generiert und schließlich in die mcs des pCL1-Vektors kloniert. Die Expression des HAS1- und HAS2-Gens wurde durch den CMV-Promotor kontrolliert.

8.3 Appendix 3

Spezifische Primer für die humanen Hyaluronsäuresynthasen wurden in Anlehnung an die bekannten Sequenzen HAS1 (NM_001523.1), HAS2 (NM_005328.1) und HAS3 (NM_005329.2) wie folgt generiert:

HAS1-F: 5'-TACAACCAGAAGTTCCTGGG-3',
HAS1-R: 5'-CTGGAGGTGTACTTGGTAGC-3';
HAS2-F: 5'-GTGGATTATGTACAGGTTTGTGA-3',
HAS2-R: 5'-TCCAACCATGGGATCTTCTT-3';
HAS3-F: 5'-GAGATGTCCAGATCCTCAACAA-3',
HAS3-R: 5'-CCCACTAATACACTGCACAC-3';

GAPDH-F: 5'-GTGAAGGTCGGAGTCAACG-3',
GAPDH-R: 5'-TGAGGTCAATGAAGGGGTC-3'

Zur Quantifizierung der Hyal1 und Hyal2 mRNA Expression wurden folgende Primerpaare verwendet:

Hyal1-F: 5'-CCAAGGAATCATGTCAGGCCATCAA-3',
Hyal1-R: 5'-CCCACTGGTCACGTTTCAGG-3';
Hyal2-F: 5'-GGCTTAGTGAGATGGACCTC-3',
Hyal2-R: 5'-CCGTGTCAGGTAATCTTTGAG-3'

Die relative mRNA Expression wurde mit GAPDH als "house keeping" Gen und mit der $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ -Methode bestimmt.

Für die Generierung der lentiviralen Überexpressionsvektoren wurde die pCL1mcs mit den Restriktionsenzymen XhoI und EcoRI restringiert. Die cDNA der humanen HAS1 und HAS2 wurde mittels RT-PCR aus Gesamt-RNA humaner glatter Gefäßmuskelzellen mit den folgenden Primerpaaren generiert:

XhoI-HAS1-F: 5'-CTCGAGATGAGACAGCAGGACGCGCCC-3',
EcoRI-HAS1-R: 5'-GAATTCTCACACCTGGACGCGGTAGCC-3';
XhoI-HAS2-F: 5'-CTCGAGATGCATTGTGAGAGGTTTCT-3',
EcoRI-HAS2-R: 5'-GAATTCTCATACATCAAGCACCATGT-3'

9. Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J.W. Fischer für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas, die immer währende Unterstützung und die Ermutigung, neue Wege zu beschreiten; darüber hinaus danke ich recht herzlich für die zahlreichen Möglichkeiten der Fortbildung und die Möglichkeit, neue Erfahrungen gesammelt haben zu dürfen.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie des Universitätsklinikums Essen für die fachliche Unterstützung im Labor und die kurzweilige Zeit, die durch viele erheiternde Gespräche "wie im Flug" verging:

Besonders danken möchte ich

Frau Sieberg für ihre Geduld und die Hilfe bei zahlreichen verwaltungsassoziierten Problemen.
Doris Petermeyer für ihre offenen Ohren, die zahlreichen, Genotypisierungs-PCRs und Gele und all die Unterstützung in den vergangenen 1 ½ Jahren.

Sören, für etliche Hilfestellungen bei Fragen den Computer betreffend und den ein oder anderen Pharmakologie-Schwank.

Annika Zimmermann für all die Hilfe im Labor (seien es Bestellungen oder, dass "man `mal wieder `was vergessen hat"); danke auch für die Umkompliziertheit und Ehrlichkeit - ich habe sie als Person schätzen gelernt.

Guang Dai, vielen Dank, für die Einführung in die Geheimnisse der Virusproduktion, für knapp vier Jahre angeregte und lustige, ertragreiche und sinnlose Diskussionen, zahlreiche Badminton-Spiele und den ein oder anderen lustigen Abend - ich habe einen Freund hinzugewonnen.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Universität Düsseldorf für die fachliche Unterstützung im Labor und all die Gespräche neben der Arbeit

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen, für all die Unterstützung, ihre Geduld und Nachsicht, die Ermutigung, nie aufzugeben. Ihr wart und seid ein so wichtiger Rückhalt für mich, dass es schwierig ist, das in Worte zu fassen - ohne euch hätte ich die vergangenen vier Jahre in vielerlei Hinsicht nicht geschafft.

Katrin und Inken, meinen beiden Schwestern, danke ich ebenso herzlich für das Ertragen so mancher Launen, das gute Zuspochen, die vielen netten Abende und all die Unterstützung, ohne die ich mehr als einmal "aufgeschmissen" gewesen wäre - ich bin so froh, dass ich euch hab`.

Ein großer und herzlicher Dank geht an meine Freundin, Melanie Hofmann, für die bedingungslose Unterstützung in den vergangenen vier Jahren, für all die aufgebrachte Geduld, die Entbehrungen und vor allen Dingen für die Momente der Ruhe und Geborgenheit. Du warst immer da, wenn ich dich brauchte.

10. *Publikationsverzeichnis*

Originalarbeiten

Dai G, Freudenberger T, Zipper P, Melchior A, Grether-Beck S, Rabausch B, de Groot J, Twarock S, Hanenberg H, Homey B, Krutmann J, Reifemberger J, Fischer JW., Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases. *Am J Pathol.* 2007 Nov;171(5):1451-61

Westermann D.*, Mersmann J.*, Melchior A.*, Freudenberger T.*, Petrik C., Schaefer L., Lüllmann-Rauch R., Lettau O., Jacoby C., Schrader J., Brand-Herrman S.M., Young M.F., Schultheiss H.P., Levkau B., Baba H.A., Unger T., Zacharowski K., Tschöpe C., Fischer J.W. Biglycan is required for adaptive remodeling after myocardial infarction. *Circulation.* 2008 Mar 11;117(10):1269-76

* authors contributed equally to the work

Freudenberger T, Oppermann M, Marzoll A, Heim HK, Mayer P, Kojda G, Weber AA, Schror K, Fischer JW (2009) Differential effects of medroxyprogesterone acetate on thrombosis and atherosclerosis in mice. *Br J Pharmacol* 158:1951-1960

Freudenberger T, Oppermann M, Heim HK, Mayer P, Kojda G, Schrör K, Fischer JW. Proatherogenic effects of estradiol in a model of accelerated atherosclerosis in ovariectomized ApoE-deficient mice. *Basic Res Cardiol.* 2010 Feb 23. [Epub ahead of print]

Nadine Nagy, Till Freudenberger, Holger Jastrow, Tatsiana Suvorava, Georg Kojda, Artur A. Weber, Süleyman Ergün, and Jens W. Fischer. Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: Novel insights into the role of hyaluronan synthesis [*Circulation, in Revision*]

Freudenberger T, Dai G, Röck K, Dorn S, Mayer P, Heim H-K, Fischer JW. Estradiol inhibits hyaluronic acid synthase expression in human vascular smooth muscle cells [*eingereicht*]

Abstracts

Westermann D., Mersmann K., Melchior A., Freudenberger T., Petrik C., Lüllmann-Racuh R., Young M.F., Levkau B., Baba H., Unger T., Zacharowski K., Tschöpe C., Fischer J.W., Cardiac dysfunction and decreased survival of biglycan-deficient mice after myocardial infarction. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2007) 375(Suppl. 1):295, p.63

T. Freudenberger, M. Oppermann, A. Marzoll, H.-K. Heim, P. Mayer, G. Kojda, K. Schrör, J. W. Fischer (2007). Der Verlust von endogenem Estradiol nach bilateraler Ovariectomie zeigt in ApoE-Defizienten Mäusen anti-Atherogene Effekte und verbessert die Endothelfunktion. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 132 2007 Suppl. 1

Freudenberger T., Oppermann M., Marzoll A., Heim K.H., Mayer P., Kojda G., Schrör K., Fischer J.W. Effects of estradiol and medroxyprogesterone acetate on atherosclerosis and thrombosis in ApoE^{-/-} mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2008) 377(Suppl 1):1-98

Freudenberger T., Oppermann M., Marzoll A., Heim H.-K., Mayer P., Kojda G., Schrör K., Fischer JW. Effects of estrogens and gestagens on atherosclerosis and thrombosis after surgically induced menopause in ApoE^{-/-} mice. *J Hypertens.* 2008, Vol. 26 (suppl. 1)

Freudenberger T., Oppermann M., Marzoll A., Heim K.H., Mayer P., Kojda G., Schrör K., Fischer J.W. Estradiol and medroxyprogesterone acetate: differential roles in atherosclerosis, endothelial function and thrombosis after surgically induced menopause in ApoE^{-/-} mice. *European Heart Journal* (2008) 29 (Abstract Supplement), 864-865

Freudenberger T., Dai G., Mayer P., Heim H.-K., Schrör K., Fischer J.W. Estradiol suppresses hyaluronic acid synthase expression in human vascular smooth muscle cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2009) 379, (Suppl 1):1-100

Twarock S., Freudenberger T., Poscher E., Dai G., Janasch K., Dullin C., Alves F., Stoecklein N., Savani R.C., Homey B., Fischer J.W. Esophageal cancer cell-derived hyaluronan synthase 3 promotes malignant phenotype and critically regulates tumor progression in vitro and in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2009) 379, (Suppl 1):1-100

Pexa K., Hagedorn I., Varga-Szabo D., Freudenberger T., Fischer J.W., Piekorz R., Nieswandt B., Nürnberg B. Altered hemostasis and reduced thrombus stability in mice lacking the pertussis toxin-sensitive G protein G alpha i2. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2009) 379, (Suppl 1):1-100

T. Freudenberger, M. Oppermann, H.-K. Heim, P. Mayer, G. Kojda, K. Schrör, J.W. Fischer. Anti-atherogenic but pro-thrombotic effects of medroxyprogesterone acetate in ApoE^{-/-} mice. *Clin Res Cardiol* 98- Suppl 1, April 2009, P1323

Nagy N, Freudenberger T., Suvorava T, Kojda G, Fischer JW. Sytemic hyaluronan inhibition increases atherosclerosis in mice *E Journal of the British Pharmacological Society* 2009; Volume 7 Issue 1 015P.

Nadine Nagy, Till Freudenberger, Tatsiana Suvorava, Georg Kojda, Jens W Fischer. Inhibition of Hyaluronan Synthesis by 4-Methylumbelliferone Aggravates Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29(7):e9-e130

Nadine Nagy, Till Freudenberger, Tatsiana Suvorava, Georg Kojda, Jens W. Fischer Abstract 5893: Pro-Atherogenic Effect of Hyaluronan Synthesis Inhibition in ApoE-Deficient Mice. *Circulation.* 2009;120:S1171-b

Freudenberger T., Dai G., Röck K., Mayer P., Heim H.-K., Fischer J.W. Lentiviral overexpression of hyaluronic acid synthases 1 and 2 restores estradiol-mediated inhibition of PDGF-induced proliferation in human vascular smooth muscle cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2010) 381 (Suppl 1):1-92

Nagy N., Freudenberger T., Suvorava T., Kojda G., Fischer J.W. Pharmacologic inhibition of hyaluronan synthesis has detrimental vascular effects in apoE-deficient mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2010) 381 (Suppl 1):1-92

Röck K., Meusch M., Fuchs N., Zipper P., Freudenberger T., Krutmann J., Reifemberger J., Fischer J.W. Estrogen augments dermal hyaluronan and proteoglycans during extrinsic skin ageing in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2010) 381 (Suppl 1):1-92

T. Freudenberger, G. Dai, P. Mayer, H.-K. Heim, J. W. Fischer. Estradiol-mediated inhibition of hyaluronic acid synthase expression and proliferation is restored after lentiviral overexpression of hyaluronic acid synthases 1 and 2 in vascular smooth muscle cells. *Clin Res Cardiol* 99, Suppl 1, April 2010, P690

N. Nagy, T. Freudenberger, H. Jastrow, T. Suvorava, G. Kojda, A.-A. Weber, S. Ergün, J. W. Fischer. Pharmacologic inhibition of hyaluronan synthesis by 4-methylumbelliferone aggravates atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Clin Res Cardiol* 99, Suppl 1, April 2010, P399

Preise

Young Investigator Award der Deutschen Hochdruckliga im November 2007

TravelGrant der Deutschen Hochdruckliga im Juni 2008

DGPT-Poster-Preis der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 50. Jahrestagung, 2009

11. Ausgewählte Originalarbeiten

RESEARCH PAPER

Differential effects of medroxyprogesterone acetate on thrombosis and atherosclerosis in mice

Till Freudenberger¹, Marc Oppermann², Andrea Marzoll³, Hans-Karl Heim³, Peter Mayer³, Georg Kojda², Artur A. Weber¹, Karsten Schrör² and Jens W. Fischer¹

¹Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen, Essen, ²Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany, and

³Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM), Bonn, Germany

Background and purpose: The risk for cardiovascular events including venous and arterial disease and stroke is elevated after treatment with estrogen and medroxyprogesterone acetate (MPA) in postmenopausal women. Here, we have investigated the effect of MPA on arterial thrombosis and atherosclerosis in a murine model of atherosclerosis.

Experimental approach: Apolipoprotein E (ApoE)^{−/−} mice were bilaterally ovariectomized and treated with placebo, MPA (27.7 µg·day^{−1}) and MPA + 17-β-oestradiol (E₂; 1.1 µg·day^{−1}) for 90 days, on a Western-type diet. Thrombotic response was measured in a photothrombosis model, platelet activation by fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis (CD62P) and thrombin generation by the endogenous thrombin potential (ETP). Furthermore, aortic plaque burden and aortic root plaque composition were determined.

Key results: MPA and MPA + E₂-treated animals showed an aggravated thrombotic response shown by significantly reduced time to stable occlusion. The pro-thrombotic effect of MPA was paralleled by increased ETP whereas platelet activation was not affected. Furthermore, MPA + E₂ reduced the number of cells positive for α-smooth muscle actin and increased hyaluronan in the plaque matrix. Interestingly, total plaque burden was reduced by MPA but unchanged by MPA + E₂.

Conclusion and implications: Long-term treatment with MPA and MPA + E₂ increased arterial thrombosis despite inhibitory effects of MPA on atherosclerosis in ApoE-deficient mice. Increased thrombin formation, reduced smooth muscle content and remodelling of non-collagenous plaque matrix may be involved in the pro-thrombotic effects. Thus, MPA exhibits differential effects on arterial thrombosis and on atherosclerosis.

British Journal of Pharmacology (2009) **158**, 1951–1960; doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00470.x; published online 26 November 2009

Keywords: progestins; hyaluronan; atherosclerosis; thrombosis; hormone replacement therapy

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; CEE, conjugated equine estrogens; CHD, coronary heart disease; E₂, 17-β-oestradiol; ECM, extracellular matrix; ETP, endogenous thrombin potential; FITC, fluorescein-isothiocyanate; HA, hyaluronan; HAbP, hyaluronan binding protein; HRT, hormone replacement therapy; MPA, medroxyprogesterone acetate; OVX, ovariectomized; PBS, phosphate-buffered saline; PE, phycoerythrin; PPP, platelet-poor plasma; PRP, platelet-rich plasma; SMC, smooth muscle cells; SNAP, S-nitroso-N-acetyl-D, L-penicillamine; WHI, World Health Initiative

Introduction

Hormone replacement therapy (HRT) was expected to prevent cardiovascular events in postmenopausal women. This assumption was based on several epidemiological and observational studies suggesting that postmenopausal oestrogen therapy would reduce mortality from coronary heart disease

(CHD) (Stampfer *et al.*, 1985; Grodstein *et al.*, 2000). Furthermore, animal studies in monkeys and mice also suggested anti-atherosclerotic effects of oestrogen substitution (Adams *et al.*, 1990; Bourassa *et al.*, 1996). However, recently large prospective randomized clinical trials questioned this concept and revealed increased thromboembolic event rates, including stroke (Rossouw *et al.*, 2002; Manson *et al.*, 2003; Wassertheil-Smoller *et al.*, 2003; Cushman *et al.*, 2004). Therefore, the concept that oestrogens are generally protective against CHD in women was abandoned and long-term HRT is no longer recommended (Rossouw *et al.*, 2002). However, it is considered that oestrogens might protect from atherosclerosis

Correspondence: Jens W. Fischer, Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen, Hufelandstrasse 55, 45122 Essen, Germany. E-mail: j.fischer@uk-essen.de

Received 1 April 2009; revised 3 July 2009; accepted 28 July 2009

only in young women if initiated early after menopause, whereas treatment of women with advanced atherosclerosis, years or decades after menopause might lead to worsening of clinical outcomes ('window of opportunity') (Dubey *et al.*, 2005; Rossouw *et al.*, 2007).

A trend towards inhibition of CHD was observed in the arm of the Women's Health Initiative (WHI) trial with conjugated equine oestrogens (CEEs) alone (Anderson *et al.*, 2004). In contrast in the arm receiving CEE plus medroxyprogesterone acetate (MPA) a trend towards increased CHD was recorded, which might be an indication of an effect of MPA on cardiovascular disease and perhaps atherothrombosis (Rossouw *et al.*, 2002). Comprehending the role of progestin therapy is, however, complicated by the fact that many progestin derivatives have been developed that differ with respect to the concomitant activation or antagonism of other steroid receptors. MPA activates glucocorticoid receptors, which could mimic part of the anti-atherosclerotic effects of glucocorticoids (Asai *et al.*, 1993), and has, on the other hand, also anti-androgenic activity, which might diminish protective oestrogen effects. In monkeys, MPA interferes with anti-atherosclerotic oestrogen effects whereas progesterone does not (Adams *et al.*, 1990; Adams *et al.*, 1997). Furthermore, the effect on endothelial cells is variable between the progestins; for instance, progesterone increases endothelial nitric oxide (NO) release whereas MPA does not, a finding attributed to differences in the downstream signalling in endothelial cells (Simoncini *et al.*, 2004).

MPA is currently used in addition to HRT also in premenopausal women as a contraceptive and to treat various gynaecological conditions such as endometriosis, polycystic ovarian syndrome and irregular uterine bleeding (Cullins, 1996). Further research on the effects of MPA on atherothrombosis in animal models will contribute to a better understanding of its effects on CHD and the underlying mechanisms of this frequently used progestin. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of MPA alone or in combination with oestradiol on arterial thrombosis and atherosclerosis in apolipoprotein E (ApoE)-deficient mice.

Methods

Animals

All animal care and experimental procedures complied with the guidelines for the use of experimental animals as outlined in the 'Deutsches Tierschutzgesetz' and according to the 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' (NIH publication 85-23, revised 1985). Homozygous ApoE-deficient mice (strain: Maeda) were obtained from Taconic M&B (Ejby, Denmark). Mice were kept in a 12 h light/dark cycle with access to food and water *ad libitum*. At weaning (age 28 days) mice were bilaterally ovariectomized (OVX). Anaesthesia was performed using a mixture of ketamine (100 mg·kg⁻¹) and xylazine (5 mg·kg⁻¹). Mice were randomly assigned to three treatment groups, namely, placebo, MPA and MPA + 17- β -oestradiol (E₂). At 42 days of age, placebo pellets or slow-release hormone pellets (Innovative Research of America), prepared to dispense 27.7 μ g·day⁻¹ MPA or 1.1 μ g·day⁻¹ E₂ for 90 days, were implanted subcutaneously.

The dose of oestrogen used in our study was based on earlier studies by Elhage *et al.* (1997) who observed maximal inhibition of fatty streak formation with E₂ at doses between 0.83 μ g·day⁻¹ and 1.6 μ g·day⁻¹. The dose of MPA used in our study was based on earlier studies by Shultz *et al.* (2004) and Hanke *et al.* (1996) who used progestin doses equalling a progestin/oestrogen ratio between 10:1 and 100:1. The treatment period was based on earlier studies performed by Bourassa *et al.*, (1996) and Marsh *et al.* (1999) who described anti-atherosclerotic actions of E₂. Starting at the day of pellet-implantation mice were fed a Western-type diet containing 21% butter fat and 0.15% cholesterol by weight (Sniff, Soest, Germany). Animal weights were determined after 132 days. The experimental design is summarized in Figure 1A. The drug/molecular target nomenclature used here follows Alexander *et al.* (2008).

Determination of aortic plaque burden

Animals were perfusion fixed with 4% paraformaldehyde, aortas were carefully removed and postfixed with 4% paraformaldehyde (4°C, overnight). The next day aortas were transferred into 1× phosphate-buffered saline (PBS), freed from adventitia and subsequently equilibrated in 78% methanol for 5 min. Subsequently, Oil-Red-O staining was performed for 90 min at room temperature and aortas washed in 78% methanol for 10 min afterwards. Finally *en face* pictures were taken and the percentage of Oil-Red-O stained area of total surface area was determined by ImageJ 1.37v software (National Institutes of Health, Bethesda MD, USA) and defined as plaque burden. Eighteen to 21 mice were analysed in each treatment group.

Measurement of lipoprotein profiles

Total cholesterol and triglycerides were determined after feeding by the department of Clinical Chemistry of the University Clinics Düsseldorf according to standard procedures (enzymatic colour-reaction kits; Chol and TG, cobas, Roche, Mannheim, Germany). Ten to 13 mice were analysed in each treatment group.

Photochemical induction of thrombosis

Thrombosis of the right carotid artery was induced by injection of Rose Bengal and subsequent irradiation using a green light laser as previously described (Wilson *et al.*, 2003). Time to first occlusion was defined as the time when blood-flow first ceased to zero. Time to stable occlusion was defined as the time at which blood-flow stayed at zero for ≥ 10 min. The frequency of flow recovery was determined in the interval between first and stable occlusion. Every time when the blood-flow increased to more than 0.09 mL/min after an intermediate occlusion was defined as one event of flow-recovery. The sum of these events was set as frequency of flow recovery. Two out of 10 placebo mice and one out of nine MPA + E₂ animals died before stable occlusion and were excluded. Finally, 6–7 mice were analysed in each treatment group.

Analysis of platelet activation and endogenous thrombin potential

Whole blood was obtained by cardiac puncture of mice anaesthetized with a mixture of ketamine (100 mg·kg⁻¹) and

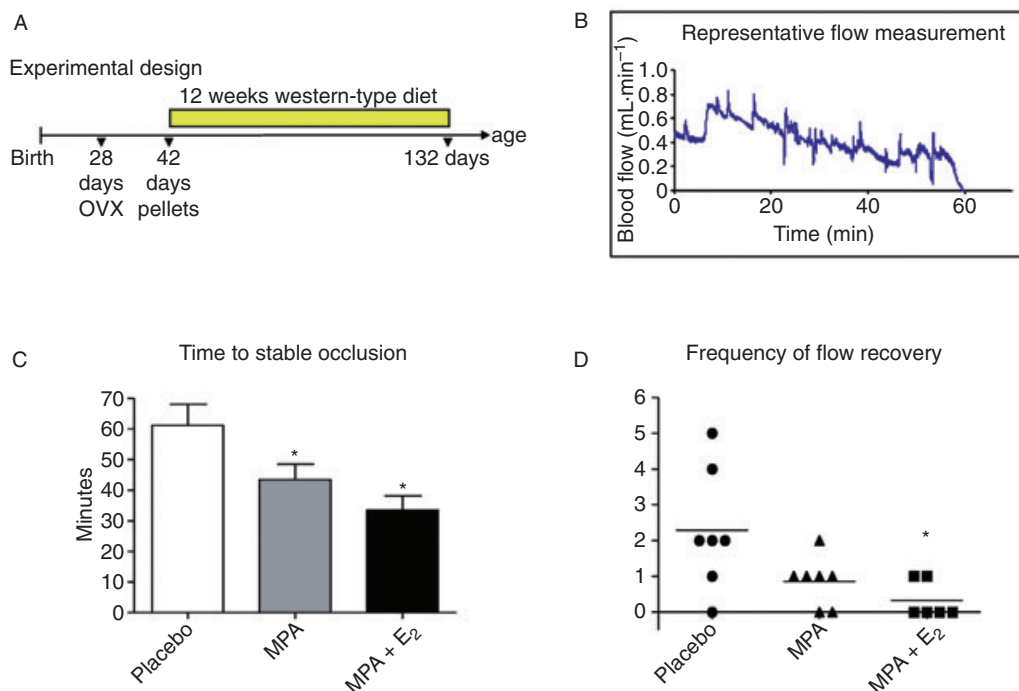


Figure 1 Thrombotic response. (A) Experimental design. (B) Representative blood-flow measurement after initiation of photochemical injury at time 0. (C) Times to stable occlusion from mice receiving placebo, medroxyprogesterone acetate (MPA; 27.7 $\mu\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$) and MPA + E₂ (1.1 $\mu\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$). (D) Graph showing the frequency of flow-recovery as a measure of thrombus stability in mice treated with placebo, MPA and MPA + E₂. Data represent means \pm standard error of the mean; $n = 6-8$, *, $P < 0.05$ versus placebo.

xylozine (5 mg·kg⁻¹). Sodium citrate (0.02 M, final concentration) was used as anticoagulant. Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by centrifugation at 850× *g* for 45 s and diluted 1:10 with PBS. The percentage of platelets in PRP was determined after incubation of 25 μL PRP with 5 μL phycoerythrin (PE)-conjugated rat anti-mouse anti-CD41 antibody (BD Pharmingen, Heidelberg, Germany) for 30 min and diluted with 500 μL isotone for analysis on a Cytomics FC 500 Cytometer (Beckman Coulter, Krefeld, Germany). PE-conjugated mouse IgG1-PE (Beckman Coulter) was used as isotypic control. PRP was characterized by 98–99% CD41 positive particles. Platelet P-selectin (CD62P) expression as read out for platelet activation was determined by FACS analysis using CD62P-antibody (FITC-conjugated rat-anti-mouse anti-CD62P antibody, BD Pharmingen) and the respective FITC-conjugated isotypic control (mouse IgG1-FITC, Beckman Coulter) as previously described (Zimmermann *et al.*, 2003). To detect differences in the magnitude of maximal platelet activation, PRP was preincubated with convulxin (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Alexis, Lörrach, Germany) for 5 min and subsequently CD62P surface expression was detected as described above. Analysis was performed using CXP Analysis Software 2.2. Platelet-poor plasma (PPP) was prepared from the PRP and used for the measurement of endogenous thrombin potential (ETP) using a modified thrombinoscope method (Stampfuss *et al.*, 2005). Briefly, 15 μL PPP, 10 μL platelet membranes, 1 pmol innovin as tissue factor source (final concentration), 55 μL PBS and 20 μL recalcification buffer [20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, pH 7.35, 60 mg/mL bovine serum albumin (BSA) and 100 mM Ca²⁺ (final concentration)] containing the fluorogenic substrate (Z-Gly-Gly-Arg-7-amino-

4-methylcoumarin; Bachem, Weil am Rhein, Germany) were mixed and thrombin generation was monitored for 60 min using a Fluoroscan Ascent plate reader (Fluoroscan Ascent, Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland). Resulting curves were analysed using Thrombinoscope Analysis 3.0 software. For these mechanistic studies on platelet activation and thrombin generation in response to hormone treatment a separate group of OVX mice was treated as described earlier but for only 2 weeks.

Contraction-relaxation experiments

Endothelial function was examined in 5 mm thoracic aortic ring segments as previously described (Suvorava *et al.*, 2005). Briefly, mice were killed by CO₂, aortas were cautiously removed and aortic rings prepared. Subsequently aortic rings were repeatedly depolarised with 80 mM KCl. Aortic rings were precontracted submaximally with 200 nM phenylephrine and endothelium-dependent relaxation induced by cumulative addition of acetylcholine (10⁻⁹–10⁻⁵ M). Endothelium-independent relaxation to increasing concentrations of the NO-donor S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP) (10⁻¹⁰–10⁻⁵ M) was examined after precontraction with increasing concentrations of phenylephrine (10⁻⁹–10⁻⁵ M). Two aortic rings from each animal were measured and the resulting data averaged. Five to seven mice were analysed in each treatment group.

Histochemistry and immunohistochemistry

Animals were perfusion fixed with 4% paraformaldehyde, tissues were excised and post-fixed with 4% paraformaldehyde

(4 h) and transferred to 20% sucrose (overnight) before embedding at -40°C in Tissue Tek® medium according to routine procedures. Aortic root sections ($14\ \mu\text{m}$) were fixed in ice-cold acetone for smooth muscle α -actin (α -SM-actin staining), in 96% ethanol for hyaluronic acid (HA) and Mac2 double staining or in 10% formalin for Oil-Red-O staining, for 15 min at 4°C . Primary antibody against α -SM-actin, (1:50; Abcam, Cambridge, UK) was used and α -SM-actin was detected by a sheep anti-rabbit Cy3 conjugate (1:200, Sigma, Steinheim, Germany). The accumulation of HA and the retention of macrophages in aortic root plaques was analysed by HA/Mac2 double-staining. Slides were incubated with biotinylated hyaluronic acid-binding protein (HABP; $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Seikagaku, Tokyo, Japan) at 4°C overnight. After three washes with PBS sections were incubated with streptavidin-FITC (1:200, Dako, Glostrup, Denmark). Subsequently, retention of macrophages was analysed by staining macrophage-antigen Mac2 with a rat-anti-mouse Mac2 first antibody and a rhodamineX-coupled goat-anti-rat IgG as secondary antibody on the same sections. Nuclear staining was performed by using ProLong® Gold antifade reagent with 4',6-diamidino-2-phenylindole (Invitrogen, Eugene, OR, USA). The extent of lipid deposition in aortic root plaques was evaluated by Oil-Red-O staining. 5–9 mice were analysed in each treatment group.

Image analysis

Images of all stained samples were captured at 40x magnification using a BX-50 microscope (Olympus, Hamburg, Germany) and ColorView II camera (Soft Imaging System) and AnalySIS 3.2 software (Soft Imaging System, Münster, Germany). For the quantification of α -SM actin, macrophages, hyaluronan and lipid deposits, ImageJ 1.37v software (National Institutes of Health) was used. A colour deconvolution tool was applied to 8 bit converted images to filter out the positively stained areas. Choice of threshold values and quantification of threshold-marked areas were performed as previously described (Dai *et al.*, 2007). Areas of plaque deposition in the aortic root were identified morphologically and measurements were only performed there. Measurements from at least five sections were averaged.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard error of the mean of the number of (*n*) mice. Statistical significance among the concentration-response curves was analysed by two-way analysis of variance and one-way analysis of variance was used for plaque score, quantitative image analysis, thrombosis, CD62P-expression analysis and ETPs. Frequency of flow recovery was analysed using the Kruskal–Wallis test. *P* values < 0.05 were considered as statistically significant.

Results

Arterial thrombosis

The experimental design is depicted in Figure 1A. OVX caused significant uterine atrophy, demonstrating that the procedure was effective (data not shown). Total plasma cholesterol and

Table 1 Body weight, total cholesterol and triglycerides

	Body weights (g)	Total cholesterol ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Triglycerides ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Placebo	35.0 ± 0.5	8.1 ± 0.8	0.9 ± 0.1
MPA	34.2 ± 0.6	8.9 ± 0.8	1.1 ± 0.1
MPA + E_2	$28.7 \pm 0.9^*$	7.1 ± 0.7	1.0 ± 0.2

Body weight and lipid parameters after feeding were determined at the end of the experimental period at the age of 132 days, $^*P < 0.05$ versus placebo and medroxyprogesterone acetate (MPA).

triglyceride levels (Table 1) were not affected by either form of hormone treatment. However, the combined treatment with MPA and E_2 significantly decreased body weight of mice compared with placebo, whereas animals treated with MPA alone showed no effects on body weight (Table 1). After photochemical induction of thrombus formation, the time to stable occlusion of the right carotid artery was determined. Figure 1B shows a representative chart of the decrease of blood-flow after photochemical injury. MPA significantly shortened times to occlusion of the right carotid artery (Figure 1C) suggesting an aggravated thrombotic response. In addition MPA caused a trend towards reduced frequency of flow-recovery (Figure 1D) as compared with placebo-treated animals suggesting increased stability of newly formed platelet aggregates or increased adhesion of the thrombus to the vessel wall. Both parameters, time to occlusion and frequency of flow recovery were also affected by MPA + E_2 (Figure 1C,D).

Platelet activity and endogenous thrombin potential (ETP)

To address the mechanisms that might be responsible for the pro-thrombotic effect of MPA and MPA + E_2 , platelet activation and thrombin generation were determined. FACS analysis of CD62P revealed no differences in the basal expression levels on platelets derived from placebo versus MPA and MPA + E_2 (Figure 2A,B). Activation of platelets with the snake venom convulxin resulted in a four-fold increase of CD62P expression and was not affected by MPA. In the group receiving MPA + E_2 , the platelet activation in response to convulxin was even reduced. Taken together the results do not support increased platelet activation as the reason for the shortened time to occlusion in the photothrombosis model. However, thrombin generation was affected by the hormone treatment. MPA treatment caused a significant increase of the ETP that reflects the area under the curve of the thrombin generation time course. In contrast MPA + E_2 did not alter the ETP (Figure 2C,D). Taken together, these experiments suggest that increased thrombin formation as detected by the ETP measurements may explain partially the aggravated thrombotic response in the photothrombosis model after MPA treatment.

Aortic plaque burden

Next, the extent of plaque burden was determined in order to search for the mechanisms that might underlie the increased thrombotic response in atherosclerotic mice chronically treated with MPA. Of note, MPA decreased atherosclerotic plaque burden in the thoracic and abdominal aorta by about 20% (Figure 3A,B). In mice receiving MPA + E_2 no effect

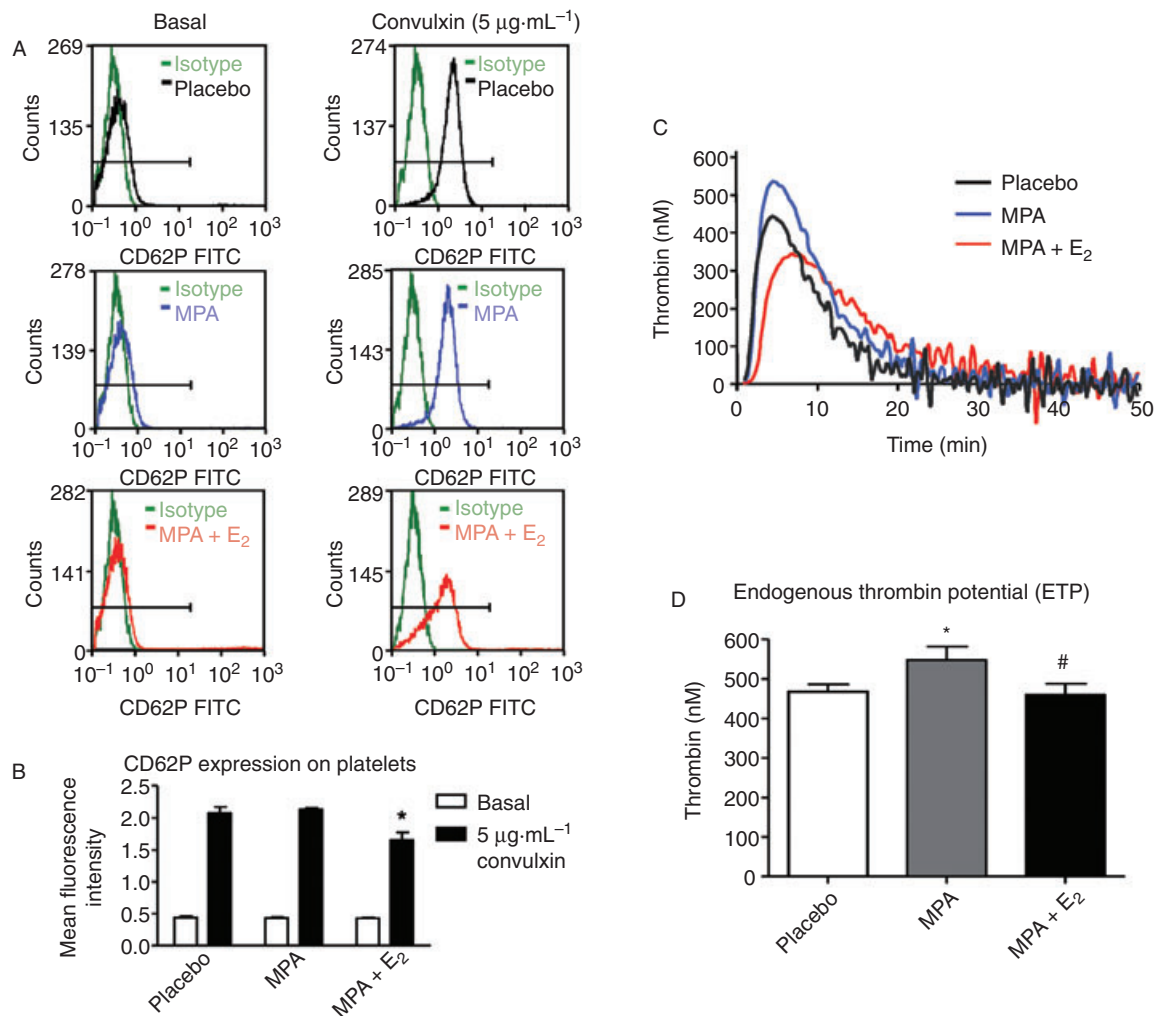


Figure 2 Platelet activation and endogenous thrombin potential (ETP) (A) Representative plots of *ex vivo* FACS analysis of CD62P-expression on platelets in platelet-rich plasma from mice treated with placebo, medroxyprogesterone acetate (MPA; 27.7 µg·day⁻¹) and MPA + E₂ (1.1 µg·day⁻¹). Left panel: basal CD62P expression; right panel: CD62P expression after stimulation with 5 µg/mL convulxin (B) Quantitative analysis of CD62P expression. (C) Representative curves for thrombin generation over time (ETP) in mice treated with placebo, MPA and MPA + E₂. (D) Quantitative analysis of ETP. Data represent means ± standard error of the mean; *n* = 6–7, **P* < 0.05 versus placebo, #*P* < 0.05 versus MPA.

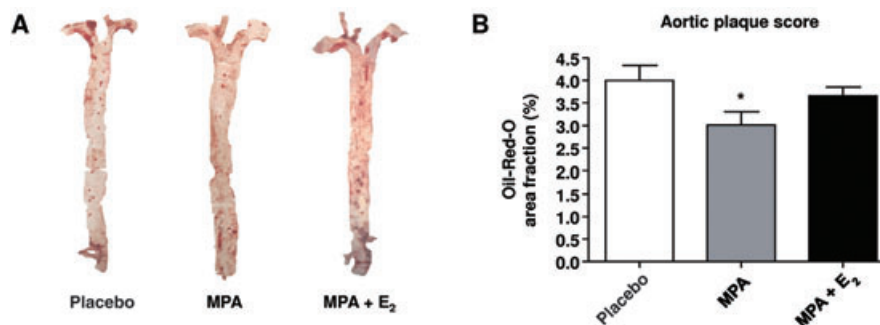


Figure 3 Plaque burden. (A) Oil-Red-O stained aortas from mice substituted with medroxyprogesterone acetate (MPA; 27.7 µg·day⁻¹) and MPA + E₂ (1.1 µg·day⁻¹). (B) Aortic plaque scores from mice treated with placebo, MPA and MPA + E₂. Data represent means ± standard error of the mean; *n* = 18–21; **P* < 0.05 versus placebo.

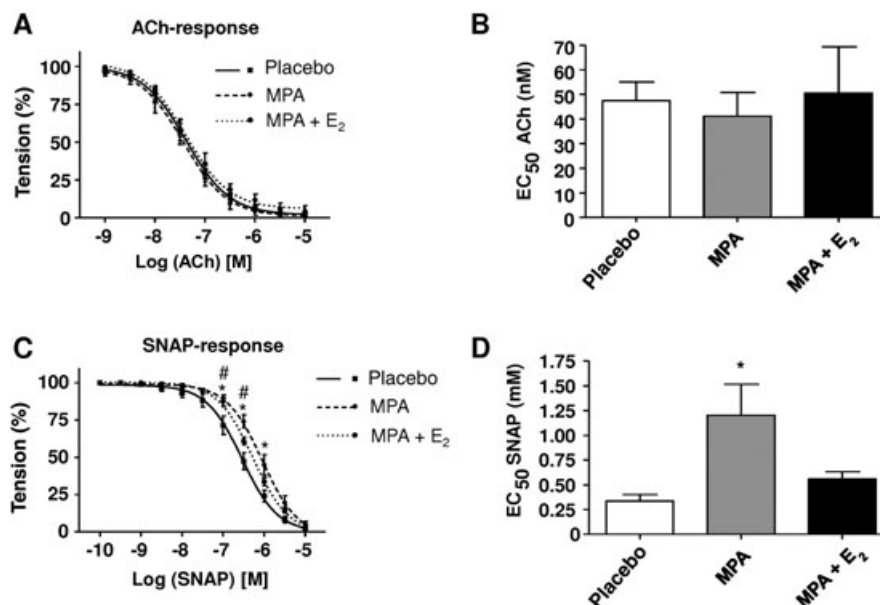


Figure 4 ACh-dependent vasorelaxation of aortic rings. (A) Concentration-response curves in response to ACh of aortic rings derived from mice treated with placebo, medroxyprogesterone acetate (MPA; 27.7 $\mu\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$) and MPA + E₂ (1.1 $\mu\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$). (B) Half maximal effective concentration (EC₅₀) values for ACh-induced vasorelaxation. (C) Concentration-response curves in response to S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP) in response to treatment with placebo, MPA and MPA + E₂. (D) EC₅₀ values for SNAP. EC₅₀ values for ACh calculated from concentration-response curves in (A). EC₅₀ values for SNAP calculated from concentration-response curves in (C). Data represent means \pm standard error of the mean; $n = 5-7$, * $P < 0.05$ for placebo versus MPA, # $P < 0.05$ for placebo versus MPA + E₂.

on atherosclerosis compared with placebo was detected (Figure 3A,B). Therefore, effects on atherogenesis are unlikely to be responsible for the aggravated thrombogenic response to MPA treatment.

Endothelium-dependent vasorelaxation

Endothelial function was considered as an underlying mechanism affecting both thrombotic responses and atherosclerosis in MPA treated mice. Thus, endothelium-dependent ACh-induced vasorelaxation of thoracic aortic rings of the chronically treated animals was determined in organ bath experiments and found to be unchanged in rings derived from both treatment groups, MPA or MPA + E₂ (Figure 4A,B), excluding the possibility that effects on endothelial function are involved in the pro-thrombotic or anti-atherosclerotic actions of MPA in this model. To evaluate the endothelium-independent effects of MPA and MPA + E₂ on vasorelaxation the response to the exogenous NO-donor SNAP was analysed. Remarkably, thoracic aortic rings from MPA-treated animals showed a significantly impaired relaxation in response to SNAP whereas aortic rings from mice receiving combined treatment did not differ from placebo (Half maximal effective concentration values SNAP: placebo, 0.34 \pm 0.07 mM; MPA, 1.20 \pm 0.31 mM; MPA + E₂: 0.56 \pm 0.08 mM, $n = 6-8$, Figure 4C,D).

Plaque composition at the aortic root

In addition the composition of atherosclerotic plaques with respect to extracellular matrix (ECM), smooth muscle cells (SMCs) and macrophages was measured. Differentiated SMC in

plaques at the aortic root were detected by α -SM-actin staining. Interestingly, MPA caused a trend to reduced α -SM-actin staining that became significant after MPA + E₂ treatment (Figure 5A-C,G). In contrast macrophage content of plaques, as determined by Mac2 immunostaining, was not affected (Figure 5D-F,H). Of note, HA content was significantly elevated after MPA + E₂ (Figure 5D-F,I). Lipid deposits in aortic root plaques (Figure 6A-D), collagen content and collagen fibril packing as evidenced by picro-sirius red staining and birefringence analysis were not affected (not shown). These data on plaque composition clearly indicated remodelling of the non collagenous ECM, namely, HA, and decreased amounts of differentiated SMC in response to MPA and MPA + E₂.

Discussion

The main findings of the present work were that, on the one hand, chronic treatment of ApoE^{-/-} mice with MPA aggravated the response in an experimental model of arterial thrombosis and, on the other hand, slightly reduced plaque burden. The model of photochemically induced thrombosis was chosen, because it is regarded as the most sensitive *in vivo* thrombosis model and one that will detect even subtle changes in the thrombotic response, with the highest sensitivity and accuracy (Westrick *et al.*, 2007). In this model, oxidative damage to the endothelium is caused by photochemical activation of Rose Bengal and subsequent adhesion of platelets to the sub-endothelial matrix and initiation of coagulation (Westrick *et al.*, 2007). Both MPA and MPA + E₂ enhanced the thrombotic response compared with the placebo-treated animals. In

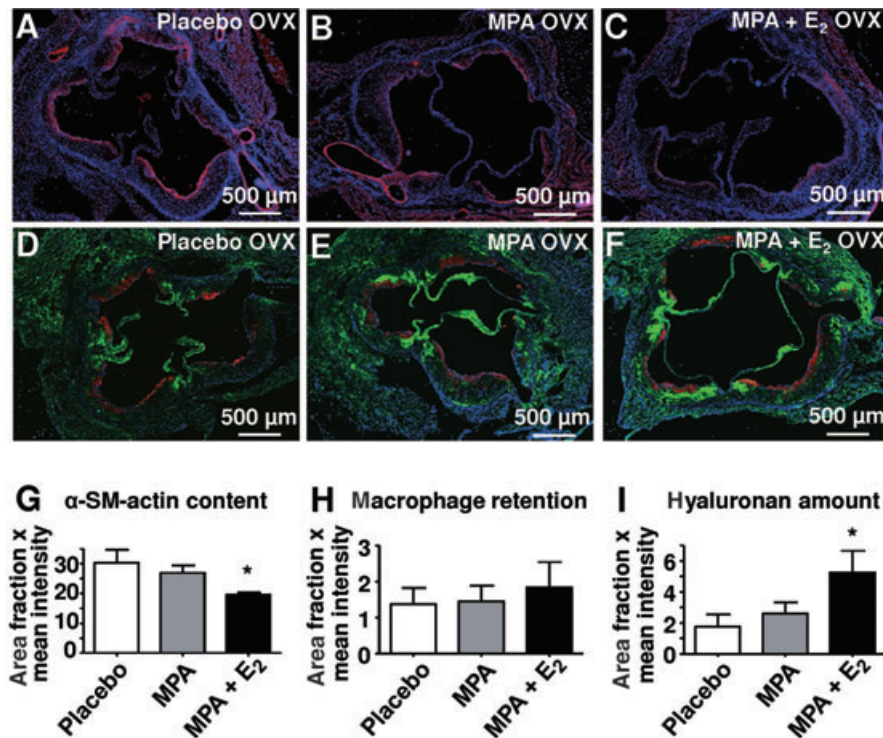


Figure 5 Plaque composition. (A–C, G) Aortic root sections stained for α -SM-actin (red) from mice treated with placebo, medroxyprogesterone acetate (MPA; 27.7 $\mu\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$) and MPA + E₂ (1.1 $\mu\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$). (D–F, H–I). Aortic root sections stained for hyaluronan and the macrophage antigen Mac2. (G–I) Data represent area fractions of positively stained antigens as determined by digital image analysis; means \pm standard error of the mean; $n = 6$ –10; * $P < 0.05$ versus placebo.

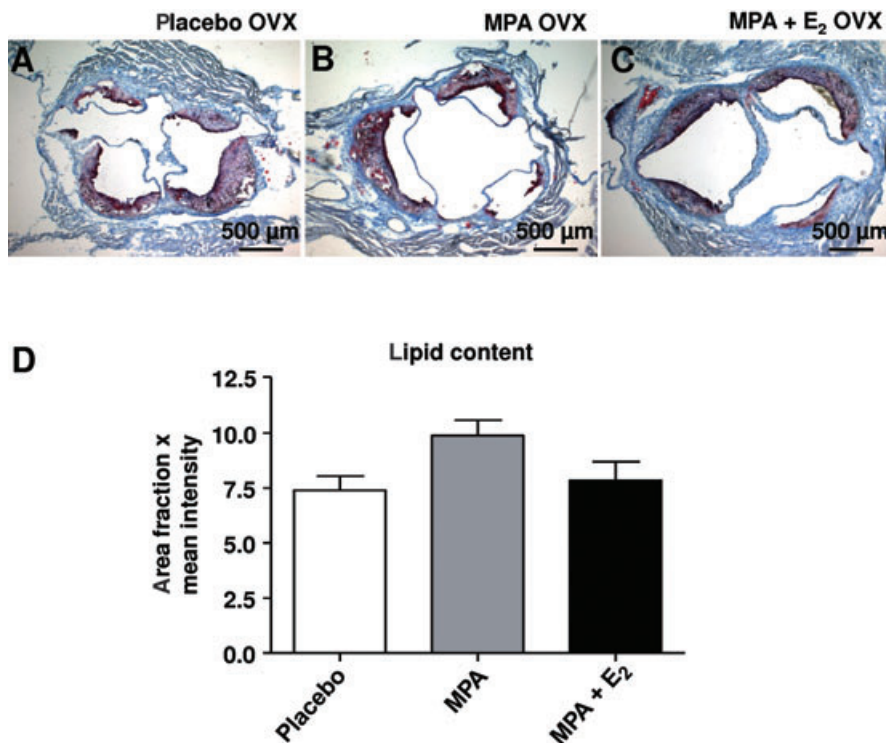


Figure 6 Lipid content of aortic root plaques. (A–C) Aortic root sections stained for lipid deposits from mice treated with placebo, medroxyprogesterone acetate (MPA; 27.7 $\mu\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$) and MPA + E₂ (1.1 $\mu\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$). (D) Data represent fractions of positively stained areas as determined by digital image analysis; means \pm standard error of the mean; $n = 5$ –9.

addition, the frequency of flow-recovery was reduced by MPA and MPA + E₂, which suggests that either the platelet aggregate was more stable or that the adhesion of the platelet thrombus to the carotid artery wall was stronger in MPA-treated OVX mice. A potential explanation of how MPA treatment might cause the increased response to photochemical induced thrombosis would be increased activation of platelets. However, mechanistic experiments revealed that basal platelet activation was not affected by any treatment and that the convulxin-induced P-selectin expression (a marker of platelet activation) was not increased by MPA or MPA + E₂. Thus, platelet activation can be excluded as the underlying cause of the pro-thrombotic state. This is in line with the finding that platelet function in postmenopausal women with CHD is not affected and that *ex vivo* platelet aggregation in response to ADP is even inhibited by both oestrogens and by MPA (Bar *et al.*, 2000). Interestingly, the ETP as a readout for the extent of thrombin generation after addition of exogenous tissue factor was increased in response to MPA, whereas no effect on the ETP was observed after MPA + E₂. Increased thrombin actions on both platelets and fibrinogen in response to MPA might therefore contribute to both increased thrombus formation and thrombus stability. This is in line with clinical results showing that oestrogens + progestins decrease anticoagulant factors such as antithrombin III and protein C (Scarabin *et al.*, 1997; Hoibraaten *et al.*, 2000; Sumino *et al.*, 2005), and increase haemostatic factors in some studies (Scarabin *et al.*, 1997). The result that MPA + E₂ treatment did not affect ETP suggests that E₂ reversed the MPA effect on ETP. Furthermore, it suggests that additional mechanisms are responsible for the observed pro-thrombotic effect of MPA + E₂ treatment.

In search of these additional mechanisms underlying the anti-atherogenic effects of MPA and the prothrombotic effect of MPA and MPA + E₂, plaque composition was determined. MPA + E₂ decreased α -SM-actin accumulation in plaques of the aortic root, which reflects either reduced SMC content and/or reduced differentiation of SMC (Yoshida *et al.*, 2007). These effects on SMC could be of significance, because less SMC accumulation is considered to weaken fibrous caps and de-differentiated SMC are synthetically more active and might therefore support neointimal expansion and luminal narrowing. In addition, HA content was increased in response to MPA + E₂ whereas collagen remained unaffected. HA is a carbohydrate component of the ECM that is thought to support SMC proliferation and migration (Evanko *et al.*, 1999) as well as intimal ECM expansion and is thus likely to be a promoter of luminal narrowing during the course of atherosclerosis (Toole *et al.*, 2002). In addition, HA has been proposed as a pro-thrombogenic matrix component, because dramatic accumulation of HA occurs at the luminal surface of human eroded plaques that caused fatal coronary thrombosis (Kolodgie *et al.*, 2002). Therefore, increased HA content of atherosclerotic plaques might be involved in the increased thrombotic response in the present model especially in response to MPA + E₂. The increase of HA and the decrease of SMC became significant only in the combination group suggesting additive effects of MPA and E₂ on these parameters and possibly providing a mechanism for the increased thrombotic response in the combination group.

In addition to the increased ETP and increased HA accumulation other mechanisms may contribute to the pro-thrombogenic effect of MPA and MPA + E₂ as well. For instance, changes in gene expression within the vascular wall such as increased expression of thrombin receptors in vascular SMC have been described before (Herkert *et al.*, 2001). In addition, down-regulation of endothelial NO synthase in endothelial cells (Zerr-Fouineau *et al.*, 2007) or up-regulation of NADPH oxidase activity (Wassmann *et al.*, 2005) have been reported in response to MPA. Interestingly, MPA has been shown to favour coronary vasospasm in monkeys, which might also confer increased cardiovascular risk (Miyagawa *et al.*, 1997). Taken together, the prothrombotic effect of MPA might be related to increased thrombin formation and/or in the case of the combination treatment due to the remodelling of the arterial wall including increased levels of HA. Future studies are needed to address the role of HA-rich ECM in the arterial responses to MPA and MPA + E₂.

Despite the pro-thrombotic effect of MPA discussed earlier, the present results demonstrated that MPA reduced the extent of atherosclerosis in the present ApoE^{-/-}-model by about 20%. It is known that ApoE deficient mice can develop atherosclerosis prior to the development of endothelial dysfunction (Fransen *et al.*, 2008) and that endothelial dysfunction is associated with atherosclerotic plaques (Crauwels *et al.*, 2003). Here we report that endothelium-dependent relaxation in response to ACh was not affected in either treatment group, thereby excluding improvement of endothelial function as a mechanism underlying the anti-atherosclerotic MPA effect. In contrast, vasorelaxation in response to SNAP was significantly impaired after MPA treatment suggesting increased degradation of exogenously formed NO, e.g. through oxidation (d'Uscio *et al.*, 2001). A potential mechanism of the anti-atherosclerotic action of MPA may be that MPA does not only activate progesterone receptors, but also has partial agonistic effects on androgen receptors and glucocorticoid receptors (Poulin *et al.*, 1989; Poulin *et al.*, 1991). The androgenic effect of MPA has been suggested to mediate anti-inflammatory actions during atherosclerosis in postmenopausal women (Wakatsuki *et al.*, 2002). Koubovec *et al.* (2004) showed that MPA reduces cytokine expression in mouse fibroblasts and mediates anti-inflammatory effects through the glucocorticoid receptor. Thus the anti-atherosclerotic effect of MPA detected in the present study might be attributable to both its androgenic and/or glucocorticosteroid properties.

Taken together, the present results on arterial thrombosis in response to MPA in mice are compatible with the clinical findings that HRT with oestrogens and MPA is associated with increased risk of MI and stroke (Hulley *et al.*, 1998; Rossouw *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2004; Rossouw *et al.*, 2007; Vickers *et al.*, 2007). The present study demonstrated that MPA was strongly pro-thrombotic either alone and in combination with E₂, although atherosclerosis was inhibited. Possible mechanisms include increased thrombin formation and changes in vascular gene expression resulting in altered plaque matrix and SMC phenotype. It might be of clinical interest to evaluate in future studies whether the pro-thrombotic effect can be differentiated from the anti-atherosclerotic effect by use of alternative progestins that

differ from MPA with respect to agonism and antagonism on other steroid receptors.

Acknowledgements

This work was funded by the Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Deutsche Forschungsgemeinschaft, SFB 612 (Teilprojekt B9).

Conflicts of Interest

None.

References

- Adams MR, Kaplan JR, Manuck SB, Koritnik DR, Parks JS, Wolfe MS *et al.* (1990). Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17-beta estradiol in ovariectomized monkeys. Lack of an effect of added progesterone. *Arteriosclerosis* **10** (6): 1051–1057.
- Adams MR, Register TC, Golden DL, Wagner JD, Williams JK (1997). Medroxyprogesterone acetate antagonizes inhibitory effects of conjugated equine estrogens on coronary artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17** (1): 217–221.
- Alexander SP, Mathie A, Peters JA (2008). Guide to Receptors and Channels (GRAC). 3rd edn. *Br J Pharmacol* **153** (Suppl. 2): S1–209.
- Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H *et al.* (2004). Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* **291** (14): 1701–1712.
- Asai K, Funaki C, Hayashi T, Yamada K, Naito M, Kuzuya M *et al.* (1993). Dexamethasone-induced suppression of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Possible mechanisms. *Arterioscler Thromb* **13** (6): 892–899.
- Bar J, Lahav J, Hod M, Ben-Rafael Z, Weinberger I, Brosens J (2000). Regulation of platelet aggregation and adenosine triphosphate release *in vitro* by 17beta-estradiol and medroxyprogesterone acetate in postmenopausal women. *Thromb Haemost* **84** (4): 695–700.
- Bourassa PA, Milos PM, Gaynor BJ, Breslow JL, Aiello RJ (1996). Estrogen reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** (19): 10022–10027.
- Crauwels HM, Van Hove CE, Holvoet P, Herman AG, Bult H (2003). Plaque-associated endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice on a regular diet. Effect of human apolipoprotein AI. *Cardiovasc Res* **59** (1): 189–199.
- Cullins VE (1996). Noncontraceptive benefits and therapeutic uses of depot medroxyprogesterone acetate. *J Reprod Med* **41** (Suppl. 5): 428–433.
- Cushman M, Kuller LH, Prentice R, Rodabough RJ, Psaty BM, Stafford RS *et al.* (2004). Estrogen plus progestin and risk of venous thrombosis. *JAMA* **292** (13): 1573–1580.
- d'Uscio LV, Baker TA, Mantilla CB, Smith L, Weiler D, Sieck GC *et al.* (2001). Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21** (6): 1017–1022.
- Dai G, Freudenberger T, Zipper P, Melchior A, Grether-Beck S, Rabausch B *et al.* (2007). Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases. *Am J Pathol* **171** (5): 1451–1461.
- Dubey RK, Imthurn B, Barton M, Jackson EK (2005). Vascular consequences of menopause and hormone therapy: importance of timing of treatment and type of estrogen. *Cardiovasc Res* **66** (2): 295–306.
- Elhage R, Arnal JF, Pieraggi MT, Duverger N, Fievet C, Faye JC *et al.* (1997). 17 beta-estradiol prevents fatty streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17** (11): 2679–2684.
- Evanko SP, Angello JC, Wight TN (1999). Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19** (4): 1004–1013.
- Fransen P, Van Assche T, Guns PJ, Van Hove CE, De Keulenaer GW, Herman AG *et al.* (2008). Endothelial function in aorta segments of apolipoprotein E-deficient mice before development of atherosclerotic lesions. *Pflugers Arch* **455** (5): 811–818.
- Grodstein F, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ (2000). A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. *Ann Intern Med* **133** (12): 933–941.
- Hanke H, Hanke S, Bruck B, Brehme U, Gugel N, Finking G *et al.* (1996). Inhibition of the protective effect of estrogen by progesterone in experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* **121** (1): 129–138.
- Herkert O, Kuhl H, Sandow J, Busse R, Schini-Kerth VB (2001). Sex steroids used in hormonal treatment increase vascular procoagulant activity by inducing thrombin receptor (PAR-1) expression: role of the glucocorticoid receptor. *Circulation* **104** (23): 2826–2831.
- Hoibraaten E, Os I, Seljeflot I, Andersen TO, Hofstad A, Sandset PM (2000). The effects of hormone replacement therapy on hemostatic variables in women with angiographically verified coronary artery disease: results from the estrogen in women with atherosclerosis study. *Thromb Res* **98** (1): 19–27.
- Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B *et al.* (1998). Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* **280** (7): 605–613.
- Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Weber DK, Kutys R, Wight TN *et al.* (2002). Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22** (10): 1642–1648.
- Koubouvec D, Berghe WV, Vermeulen L, Haegeman G, Hapgood JP (2004). Medroxyprogesterone acetate downregulates cytokine gene expression in mouse fibroblast cells. *Mol Cell Endocrinol* **221** (1–2): 75–85.
- Manson JE, Hsia J, Johnson KC, Rossouw JE, Assaf AR, Lasser NL *et al.* (2003). Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med* **349** (6): 523–534.
- Marsh MM, Walker VR, Curtiss LK, Banka CL (1999). Protection against atherosclerosis by estrogen is independent of plasma cholesterol levels in LDL receptor-deficient mice. *J Lipid Res* **40** (5): 893–900.
- Miyagawa K, Rosch J, Stanczyk F, Hermsmeyer K (1997). Medroxyprogesterone interferes with ovarian steroid protection against coronary vasospasm. *Nat Med* **3** (3): 324–327.
- Poulin R, Baker D, Poirier D, Labrie F (1989). Androgen and glucocorticoid receptor-mediated inhibition of cell proliferation by medroxyprogesterone acetate in ZR-75-1 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **13** (2): 161–172.
- Poulin R, Baker D, Poirier D, Labrie F (1991). Multiple actions of synthetic 'progestins' on the growth of ZR-75-1 human breast cancer cells: an *in vitro* model for the simultaneous assay of androgen, progestin, estrogen, and glucocorticoid agonistic and antagonistic activities of steroids. *Breast Cancer Res Treat* **17** (3): 197–210.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML *et al.* (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* **288** (3): 321–333.

- Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, Wu L, Barad D, Barnabei VM *et al.* (2007). Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA* **297** (13): 1465–1477.
- Scarabin PY, Alhenc-Gelas M, Plu-Bureau G, Taisne P, Agher R, Aiach M (1997). Effects of oral and transdermal estrogen/progesterone regimens on blood coagulation and fibrinolysis in postmenopausal women. A randomized controlled trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17** (11): 3071–3078.
- Shultz JM, Zhu XD, Knopp RH, Leboeuf RC, Rosenfeld ME (2004). Norgestimate and medroxyprogesterone acetate do not attenuate the atheroprotective effects of 17beta-estradiol in ovariectomized, apolipoprotein E-deficient mice. *Fertil Steril* **82** (Suppl. 3): 1133–1139.
- Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Willis MY, Garibaldi S *et al.* (2004). Differential signal transduction of progesterone and medroxyprogesterone acetate in human endothelial cells. *Endocrinology* **145** (12): 5745–5756.
- Stampfer MJ, Willett WC, Colditz GA, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH (1985). A prospective study of postmenopausal estrogen therapy and coronary heart disease. *N Engl J Med* **313** (17): 1044–1049.
- Stampfuss JJ, Schror K, Weber AA (2005). Green tea catechins containing a galloyl group in the 3' position inhibit tissue factor-induced thrombin generation. *Thromb Haemost* **93** (6): 1200–1201.
- Sumino H, Ichikawa S, Sawada Y, Sakamoto H, Kumakura H, Takayama Y *et al.* (2005). Effects of hormone replacement therapy on blood coagulation and fibrinolysis in hypertensive and normotensive postmenopausal women. *Thromb Res* **115** (5): 359–366.
- Suvorava T, Lauer N, Kumpf S, Jacob R, Meyer W, Kojda G (2005). Endogenous vascular hydrogen peroxide regulates arteriolar tension *in vivo*. *Circulation* **112** (16): 2487–2495.
- Toole BP, Wight TN, Tammi MI (2002). Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. *J Biol Chem* **277** (7): 4593–4596.
- Vickers MR, MacLennan AH, Lawton B, Ford D, Martin J, Meredith SK *et al.* (2007). Main morbidities recorded in the women's international study of long duration oestrogen after menopause (WISDOM): a randomised controlled trial of hormone replacement therapy in postmenopausal women. *BMJ* **335** (7613): 239.
- Wakatsuki A, Okatani Y, Ikenoue N, Fukaya T (2002). Effect of medroxyprogesterone acetate on vascular inflammatory markers in postmenopausal women receiving estrogen. *Circulation* **105** (12): 1436–1439.
- Wassertheil-Smoller S, Hendrix SL, Limacher M, Heiss G, Kooperberg C, Baird A *et al.* (2003). Effect of estrogen plus progestin on stroke in postmenopausal women: the Women's Health Initiative: a randomized trial. *JAMA* **289** (20): 2673–2684.
- Wassmann K, Wassmann S, Nickenig G (2005). Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. *Circ Res* **97** (10): 1046–1054.
- Westrick RJ, Winn ME, Eitzman DT (2007). Murine models of vascular thrombosis (Eitzman series). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27** (10): 2079–2093.
- Wilson KM, Lynch CM, Faraci FM, Lentz SR (2003). Effect of mechanical ventilation on carotid artery thrombosis induced by photochemical injury in mice. *J Thromb Haemost* **1** (12): 2669–2674.
- Yoshida T, Gan Q, Shang Y, Owens GK (2007). Platelet-derived growth factor-BB represses smooth muscle cell marker genes via changes in binding of MKL factors and histone deacetylases to their promoters. *Am J Physiol Cell Physiol* **292** (2): C886–C895.
- Zerr-Fouineau M, Chataigneau M, Blot C, Schini-Kerth VB (2007). Progestins overcome inhibition of platelet aggregation by endothelial cells by down-regulating endothelial NO synthase via glucocorticoid receptors. *FASEB J* **21** (1): 265–273.
- Zimmermann N, Wenk A, Kim U, Kienzle P, Weber AA, Gams E *et al.* (2003). Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation* **108** (5): 542–547.

Proatherogenic effects of estradiol in a model of accelerated atherosclerosis in ovariectomized ApoE-deficient mice

Till Freudenberger · Marc Oppermann · Hans-Karl Heim · Peter Mayer ·
Georg Kojda · Karsten Schrör · Jens W. Fischer

Received: 5 February 2010 / Revised: 10 February 2010 / Accepted: 10 February 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Clinical studies revealed unfavorable effects of hormone replacement therapy in postmenopausal women despite strong evidence for vasoprotective effects of estrogen in animal models. Therefore, an attempt was made to address adverse effects of estradiol on atherosclerosis, endothelial function, and thrombosis in a murine model of atherosclerosis. ApoE^{-/-} mice were bilaterally ovariectomized (OVX) and substituted with placebo or 17- β -Estradiol (E₂, 1.1 and 6.6 μ g/day) on Western diet for 90 days. Low-dose E₂ (1.1 μ g/day) treatment significantly increased atherosclerotic plaque score, whereas high-dose E₂ (6.6 μ g/day) reduced aortic plaque burden. The proatherosclerotic effects of low-dose E₂ were associated with decreased total collagen in aortic root lesions and impaired acetylcholine (ACh)-induced vasorelaxation of aortic rings. On the contrary, OVX compared with control reduced atherosclerosis, increased fibrillar collagen and improved endothelial function. The thrombotic response as measured in a photothrombosis model was not significantly altered by E₂ or OVX. Taken together, differential effects on atherosclerosis of the clinical relevant low-dose E₂ compared with high-dose E₂ were demonstrated. Importantly, the

presented experimental conditions provide a model to study the untoward vascular effects of E₂ in the context of accelerated and advanced atherosclerosis.

Keywords Estrogen · Hormone replacement therapy · Atherosclerosis · Endothelial function

Introduction

Until 2002 a large body of evidence led investigators to conclude that postmenopausal hormone therapy using estrogens or combined estrogen plus progestin protects from atherosclerosis and coronary heart disease [11, 16, 17]. This concept has been supported by numerous animal studies. For example, Bourassa et al. reported that 17- β -Estradiol (E₂, 6–28 μ g/day) reduces atherosclerotic lesion development in ApoE^{-/-} mice on Western diet [5]. Elhage et al. [9] described that E₂ (0.17–8.3 μ g/day, 60 days) prevents fatty streak formation in ApoE^{-/-} mice fed a chow diet. Today the concept of E₂ being unrestrictedly atheroprotective is questioned in the light of several randomized controlled trials that have failed to prove a beneficial effect of hormone replacement therapy (HRT) using conjugated equine estrogens in postmenopausal women or even showed adverse effects [3, 13, 21]. Different attempts have been undertaken to explain the unfavorable clinical results of HRT beginning with the concept of dose-dependency and the importance of the duration of E₂ treatment [2]. Another interpretation is the “timing-hypothesis” which emphasizes the time at which E₂ substitution is started as most important factor [4]. Currently, long-term HRT for prevention of cardiovascular events or osteoporosis is no longer recommended. This might be especially important for women with preexisting coronary

T. Freudenberger · J. W. Fischer (✉)
Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Essen,
Universität Duisburg-Essen, Hufelandstrasse, 55,
45122 Essen, Germany
e-mail: j.fischer@uk-essen.de

M. Oppermann · G. Kojda · K. Schrör
Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie,
Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität,
Düsseldorf, Germany

H.-K. Heim · P. Mayer
Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM),
Bonn, Germany

heart disease (CHD) or increased cardiovascular risk factors such as dyslipidemia, obesity, diabetes and genetic predisposition for development of atherosclerosis.

These clinical results have also questioned the relevance of the animal models that demonstrated strong inhibition of atherosclerosis by E_2 . Therefore, the aim of the present study was to revisit the effects of E_2 on murine atherosclerosis. To mimic more closely the clinical situation of postmenopausal women with high risk of coronary heart disease which did not benefit from HRT the chronic effects of low-dose E_2 in ovariectomized $ApoE^{-/-}$ mice on high fat, high-cholesterol diet were studied.

Materials and methods

Animals

Homozygous $ApoE$ -deficient mice (strain: Maeda) were obtained from Taconic M&B (Denmark). Mice were kept in a 12-h light/dark cycle with access to food and water ad libitum. Mice were randomly assigned to four treatment groups, namely control, ovariectomy (OVX), placebo OVX, E_2 OVX. Bilateral ovariectomy was conducted at weaning (age 28 days). At 42 days of age placebo pellets or slow-release hormone pellets (Innovative Research of America) prepared to dispense 1.1 or 6.6 $\mu\text{g/day}$ E_2 for a time period of 90 days were implanted subcutaneously. Starting at the day of pellet-implantation, mice were fed a Western-type

diet containing 21% butter-fat and 0.15% cholesterol by weight (ssniff, Germany). The experimental design is summarized in Fig. 1a. All experiments were performed according to the guidelines for the use of experimental animals as outlined in the “Deutsches Tierschutzgesetz” and according to the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publication 85-23, revised 1985).

Histochemistry and immunohistochemistry

Animals were perfusion fixed with 4% paraformaldehyde (PFA); tissues were excised and fixed with 4% PFA (4 h) and transferred to 20% sucrose (overnight) before embedding at -40°C in Tissue Tek[®] medium according to routine procedures. Aortic root sections (14 μm) were fixed in ice-cold acetone or ethanol for 15 min at 4°C . Primary antibody against smooth muscle α -actin (α -SM-actin, 1:50, abcam) was used. α -SM-actin was detected by a sheep-anti-rabbit Cy3 conjugate (1:200, SIGMA). Affinityhistochemistry of hyaluronan was performed with biotinylated HA binding protein (2 $\mu\text{g/ml}$, Seikagaku, Japan), detected with Streptavidin-FITC (1:200, Dako, Hamburg). Macrophages were detected by an antibody against mac2 (1:400, Cedarlane, Burlington, Canada) and a Rhodamine Red-X conjugated goat anti-rat IgG (preadsorbed to rodent, 1:400, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) was used as a secondary antibody. Collagen accumulation was detected by picrosirius red staining and fibrillar collagen was analyzed by polarized light microscopy and birefringence analysis.

Lipid deposition was determined by Oil-red-O staining of the entire aorta.

Image analysis

Images of all stainings were captured at $40\times$ magnification using a BX-50 microscope (Olympus) and ColorView II camera (Soft Imaging System) and AnalySIS 3.2 software (Soft Imaging System). For quantification of α -SM actin, mac2, hyaluronan and collagen staining ImageJ 1.37v software (National Institutes of Health) was used. A color deconvolution tool was applied to 8-bit converted images to filter out the positively stained areas. Choice of threshold values and quantification of threshold-marked areas were performed as previously described [7]. Measurements from at least five sections were averaged.

Contraction–relaxation experiments

Endothelial function was examined ex vivo in 5 mm thoracic aortic ring segments by cumulative addition of acetylcholine (10^{-9} – 10^{-5} M) as previously described [22]. Two aortic rings were taken from each animal, measured and the resulting data were averaged.

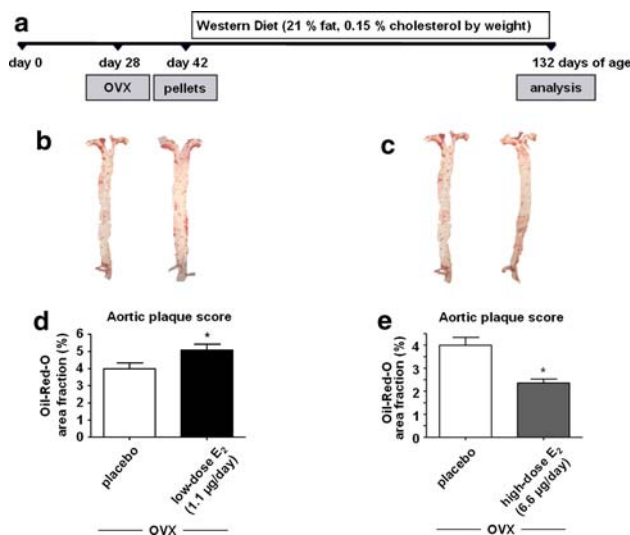


Fig. 1 Plaque burden in response to E_2 . **a** Experimental design. Two weeks after OVX either placebo or sustained release E_2 pellets were implanted subcutaneously at the neck and atherosclerosis was analyzed after 90 days. **b** Oil-red-O stained aortas from OVX mice substituted with placebo or E_2 (1.1 $\mu\text{g/day}$) and **c** high-dose E_2 (6.6 $\mu\text{g/day}$). **d**, **e** Quantitative analysis of plaque burden. Data represent mean \pm SEM; $n = 18$ –20 in **b** and $n = 4$ –18 in **c**; * $p < 0.05$

Photochemical induction of thrombosis

Thrombosis of the right carotid artery was induced by injection of Rose Bengal and subsequent irradiation using a green light laser as previously described [25]. Time to first occlusion was defined as the time when blood-flow first ceased to zero. Time to stable occlusion was defined as the time at which blood-flow stayed at zero for ≥ 10 min. The frequency of flow-recovery was determined in the interval between first and stable occlusion. Every time when the blood-flow increased to more than 0.09 ml/min after a transient occlusion was defined as one event of flow-recovery. The sum of these events was set as frequency of flow-recovery. Two out of ten OVX placebo mice died before stable occlusion and were excluded.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM of the number of (n) mice. Because the assumption of normal distribution can only be tested for $n > 25$; normal QQ-Plots with 95% confidence region were visually inspected. Because there was no need to reject the assumption of normality two-tailed unpaired Student's t test was used to compare placebo OVX and E_2 OVX groups as well as control and OVX groups. Statistical significance among the dose-response curves was analyzed by two-way analysis of variance. P values < 0.05 were considered as statistically significant.

Results

Increased atherosclerosis in response to E_2 in ovariectomized ApoE^{-/-} mice

Two weeks after ovariectomy ApoE^{-/-} mice were fed with Western diet containing 21% fat and 0.15% cholesterol for 13 weeks (Fig. 1a). On this diet the animals develop quickly progressing atherosclerosis. By implanting subcutaneous extended-release E_2 pellets a low dose of E_2 (1.1 μ g/day) was applied to mimic the cautious use of low-dose E_2 in women receiving HRT. After 13 weeks of atherogenic diet the E_2 treatment resulted in 5% plaque burden as evidenced by oil red O staining of the entire aorta (Fig. 1b, d). This effect was observed reproducibly in three experimental sets of animals amounting to a total $n = 18$ –20. Since previously other groups have reported strong anti-atherogenic effects of higher doses of E_2 in ApoE^{-/-} mice, we thought to determine if a high dose of E_2 would be atheroprotective under our experimental conditions. Indeed, in line with the previous work 6.6 μ g/day E_2 caused a strong reduction of the plaque burden (Fig. 1c, e) under the same conditions where 1.1 μ g E_2 /day increases

atherosclerosis (Fig. 1b, d). Thus, the low dose of E_2 played the key role in mediating adverse vascular effects of E_2 in ovariectomized ApoE^{-/-} mice on Western diet.

Estradiol reduces total plaque collagen in ovariectomized ApoE^{-/-} mice

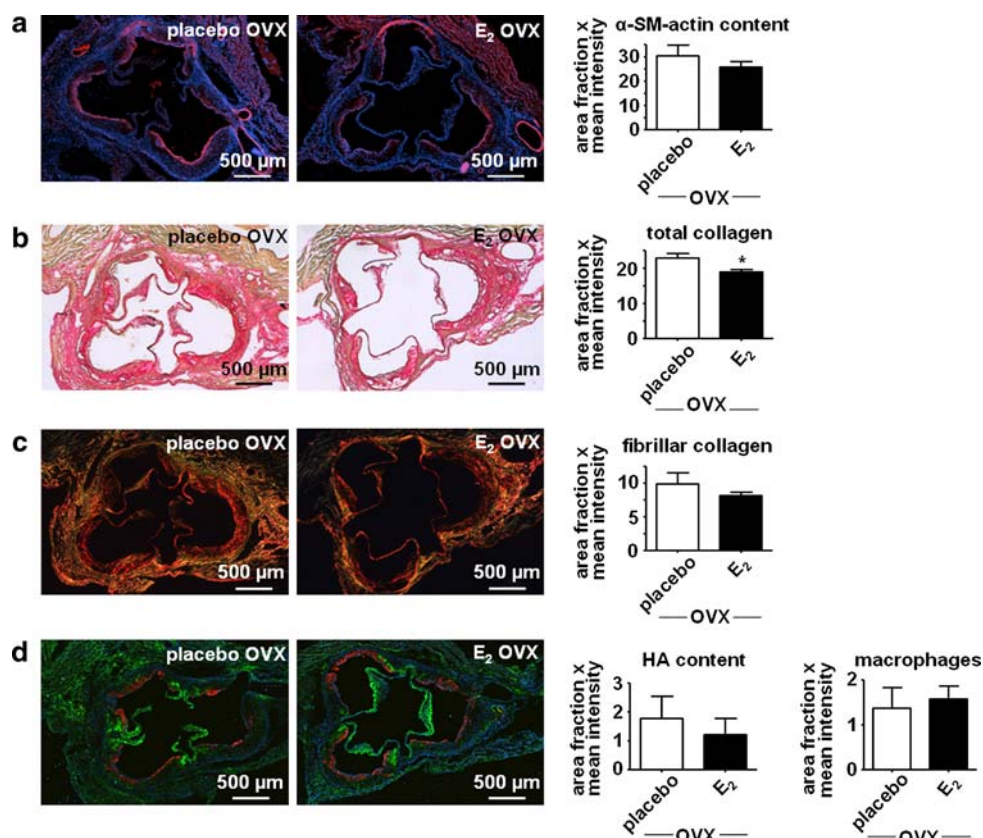
Subsequently, a thorough analysis of the composition of atherosclerotic lesions in response to subcutaneous E_2 was performed to gain further insight into the effects of E_2 . With respect to plaque architecture the content of smooth muscle cells (SMC) and collagen are thought to confer stabilizing functions and macrophages and hyaluronan are thought to promote atheroprogession. Immunohistochemical detection of α -SM-actin revealed no *significant* changes of SMC content in response to E_2 (Fig. 2a). However, total collagen was decreased as shown by Sirius red staining. Furthermore, a trend to decreased fibrillar collagen was observed as evidenced by birefringence analysis of Sirius red staining using polarized light. Immunohistochemistry of the mac2 antigen and affinityhistochemistry of hyaluronan revealed no effects of E_2 on these parameters. Taken together, the chronic treatment with E_2 mainly resulted in a decrease of total collagen content of atherosclerotic plaques and trends to decreased fibrillar collagen and SMC content (Fig. 2).

Impaired endothelium dependent relaxation of the aorta in response to E_2

In the light of the unexpected proatherosclerotic effect of low-dose E_2 a search for underlying mechanisms was conducted. First, endothelial function was characterized and second the thrombotic response was determined. Endothelial function was assessed by ACh-dependent relaxation of aortic rings as an established measure of endothelial NO release. A right shift of the dose-response curve of ACh was documented (Fig. 3a) suggesting impaired endothelial function in atherosclerotic animals treated with E_2 . This was confirmed by significantly increased EC₅₀ of ACh dependent relaxation (Fig. 3b).¹ Subsequently, the thrombotic response was determined in the model of photochemical injury of the left carotid artery. These experiments revealed no differences in the time to stable occlusion suggesting no effect of E_2 on thrombosis (Fig. 3c). However, the propensity of established thrombi to resolve or detach prior to becoming stably occlusive showed a strong trend towards more stable thrombi after E_2 treatment (decreased frequency of flow recovery, Fig. 3d).

¹ Endothelium independent relaxation to the NO-donor S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) was not changed in response to E_2 (data not shown).

Fig. 2 Effect of OVX and OVX + E₂ on plaque composition at the aortic root. OVX mice received placebo or E₂ (1.1 µg/day). **a** Aortic root sections stained for α -SM-actin (red), **b** total collagen as determined by sirius red staining, **c** birefringence analysis of fibrillar collagen using polarized light for inspection of sirius red stained sections, **d** Double immunohistochemistry of hyaluronan (green) and mac2 (red) to detect macrophages. Quantitative image analysis is presented in the bar diagrams to the right. Data represent mean \pm SEM; $n = 6-9$; * $p < 0.05$



Therefore, analysing endothelial function and thrombotic response revealed that the endothelium became dysfunctional under E₂ treatment without causing a manifest prothrombotic state.

Reduction of endogenous estrogen secretion by ovariectomy reduces atherosclerosis

Uterine weights were determined in order to prove that subcutaneous E₂ administration resulted in physiological E₂ activity. The tropic effect on the uterus of subcutaneously administered E₂ was clearly detectable as shown in Fig. 4a. Since the substitution of low-dose E₂ increased atherosclerosis, it was next tested whether surgical ablation of endogenous E₂ secretion may have the opposite effect compared with control ApoE^{-/-} mice. Thus, control and ovariectomized ApoE^{-/-} mice were subjected to the same experimental protocol as detailed in Fig. 1a. Uterine atrophy in response to ovariectomy occurred as expected (Fig. 4b). Importantly, aortic plaque burden was reduced in ovariectomized mice compared with control (Fig. 5). Analysis of plaque composition revealed increased α SM actin staining indicating increased SMC content of the plaques and a trend towards increased fibrillar collagen accumulation in OVX mice (Fig. 6). Macrophage retention and hyaluronan accumulation were not changed by

ovariectomy (Fig. 6). Therefore, ovariectomy had inhibitory effects on atherosclerosis and changed plaque composition in the opposite direction as compared with E₂ substitution (compare to Fig. 2), which supported the conclusion that physiological E₂ promotes progression of atherosclerosis under the current experimental conditions.

Ovariectomy improves endothelial function in ApoE^{-/-} mice

Next the effect of ovariectomy on endothelial function after 13 weeks of Western diet was determined. As shown in Fig. 7a the dose-response curve of ACh induced relaxation of aortic rings was shifted to the left, indicating an improved responsiveness. This was verified by the lowered EC₅₀ for ACh.² Clearly, these results show that lack of endogenous E₂ improved endothelial function in this severe model of atheroprogession. Furthermore, although no significant differences were detected in the in vivo model of thrombosis (Fig. 7c, d) a trend towards more frequent flow recoveries was observed which is complementary to the reduced flow recoveries after E₂ treatment (compare Fig. 3d).

² In contrast, relaxation of aortic rings in response to SNAP was not altered by OVX (data not shown).

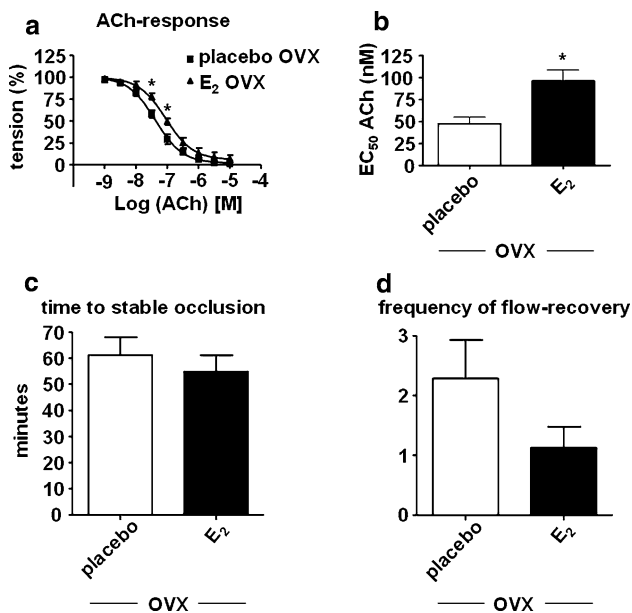


Fig. 3 Endothelial function and thrombotic response. **a** ACh-dose-response curves of aortic rings prepared from OVX mice treated with subcutaneous placebo pellets or sustained release pellets with low-dose E₂ (1.1 µg/day), **b** EC₅₀-values for ACh. Data represent mean ± SEM; *n* = 4–6, **p* < 0.05. Thrombotic response was determined in vivo after injection of Rose Bengal and laser injury of the carotid artery. **c** times to stable occlusion from OVX and ApoE^{−/−} mice receiving low-dose E₂ (1.1 µg/d), **d** frequency of flow-recovery as a measure of thrombus stability in OVX versus E₂. Data represent mean ± SEM; *n* = 7–8

Discussion

The present study clearly showed that treatment of ovariectomized mice with low doses of E₂ increased atherosclerosis, whereas high doses of E₂ inhibited atherosclerosis as described before. Furthermore, the effects of low-dose E₂ were complemented by the effects of ovariectomy which resulted in effects on atherosclerosis, plaque composition and endothelial function in the same order of magnitude, but in the opposite direction. Thus, the response to ovariectomy further supported the conclusion drawn from E₂ treatment that low, near physiological levels of E₂ promote atherosclerosis under the current experimental conditions. The efficiency of ovariectomy and subcutaneous E₂ application were validated by the appropriate effects on uterine weights. Furthermore, the number of animals used for the determination of atherosclerosis (*n* = 18–20) represent the most robust group size compared with all other studies published in the past. The responsible mechanisms might involve impaired endothelial function and changes in cellular and matrix composition. In the present study decreased endothelium-dependent relaxation occurred in response to chronic E₂ treatment. In line with our findings, Darblade et al. [8] also showed impaired ACh-dependent vasodilation after long-term treatment with

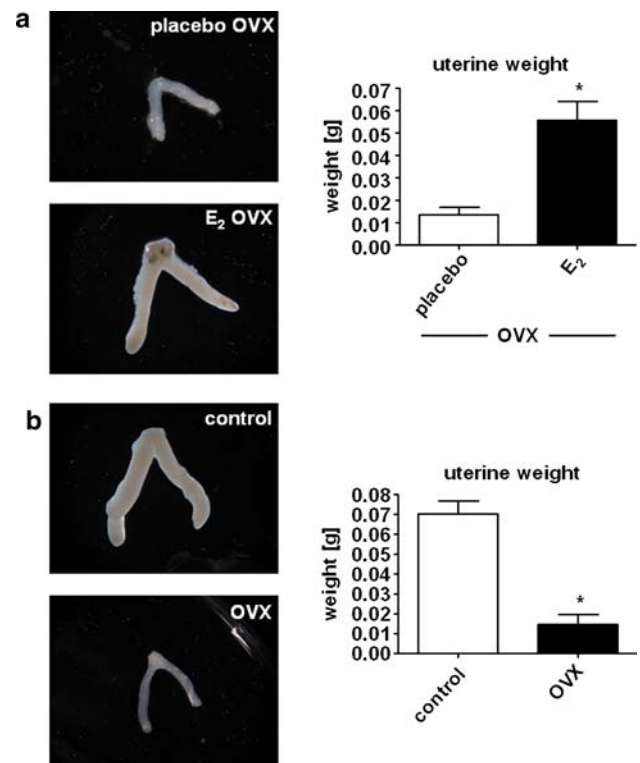


Fig. 4 Uterine weights. Representative pictures of uteri and uterine weights from **a** OVX mice receiving placebo or E₂ (1.1 µg/d) and **b** control versus OVX mice. Data represent mean ± SEM; *n* = 4–12, **p* < 0.05

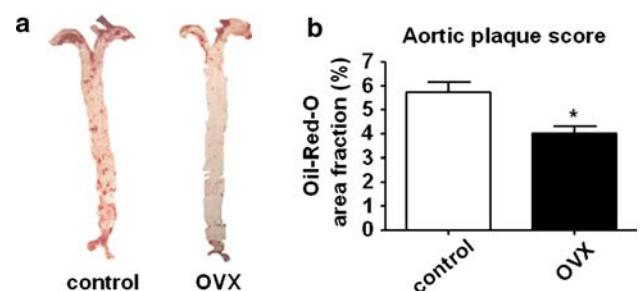


Fig. 5 Plaque burden is reduced by OVX. Oil-Red-O stained aortas from ApoE^{−/−} controls versus ovariectomized ApoE^{−/−} mice. Data represent mean ± SEM; *n* = 17–20, **p* < 0.05

E₂. With respect to plaque composition, OVX increased and E₂ partially reduced α-SM-actin accumulation in plaques of the aortic root which might be due to decreased SMC content or reduced differentiation of SMC [26]. This is in line with inhibition of SMC differentiation by estrogen receptor α in human aortic SMC in vitro [18]. The effects of OVX and hormone treatment on endothelial function might be of significance since impaired endothelial function is thought to precede the development of atherosclerosis in man [20] and to a lesser extent also in mice [6, 24]. It is conceivable that a prothrombotic state may also

Fig. 6 Effect of OVX on plaque composition at the aortic root. Atherosclerotic plaques at the aortic root were analyzed in ApoE^{-/-} mice without and after OVX at the age of approximately 19 weeks. **a** Aortic root sections stained for α -SM-actin (red), **b** Total collagen as determined by sirius red staining, **c** Birefringence analysis of fibrillar collagen using polarized light for inspection of sirius red stained sections, **d** Double immunohistochemistry of hyaluronan (green) and mac2 (red) to detect macrophages. Quantitative image analysis is presented in the bar diagrams to the right. Data represent mean \pm SEM; $n = 6-9$, * $p < 0.05$

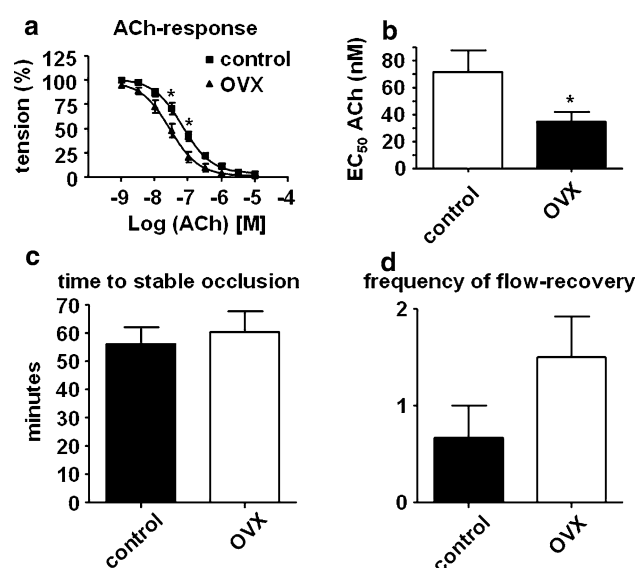
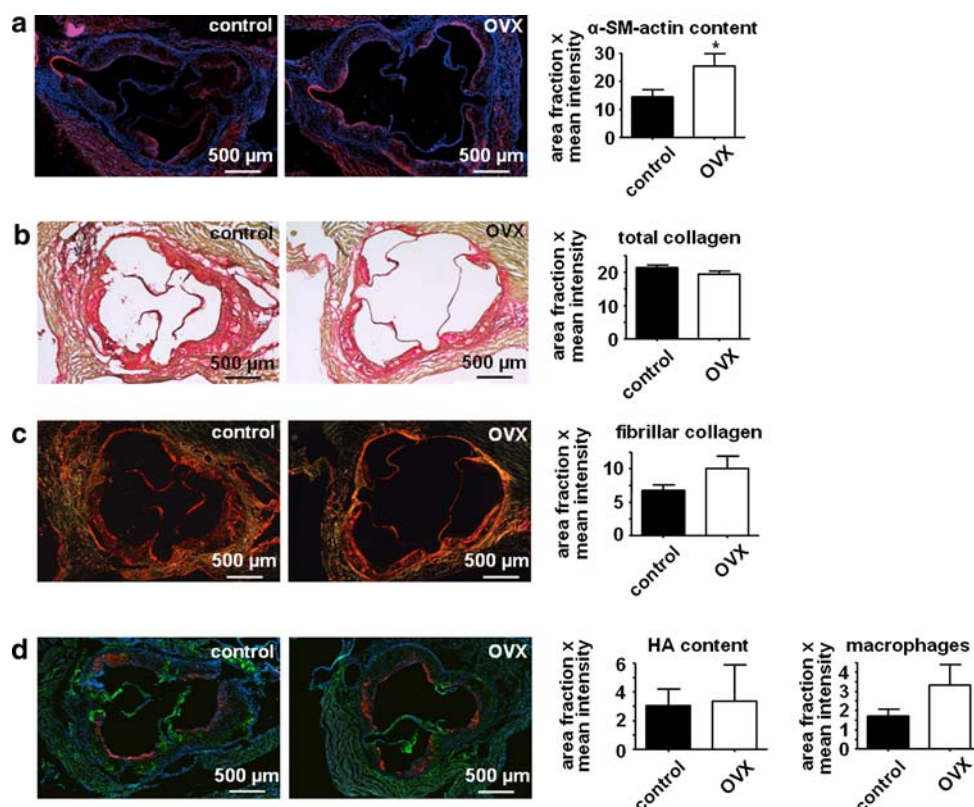


Fig. 7 Endothelial function and thrombotic response. Endothelium dependent relaxation was determined ex vivo and the thrombotic response was assessed in vivo. **a** ACh-dose-response curves of aortic rings prepared from control ApoE^{-/-} mice or ApoE^{-/-} mice after ovariectomy (OVX). **b** EC₅₀-values for ACh. Data represent mean \pm SEM; $n = 5-7$, * $p < 0.05$. Thrombotic response was determined in vivo after injection of Rose Bengal and laser injury of the carotid artery. **c** Times to stable occlusion from control or OVX ApoE^{-/-} mice, **d** frequency of flow-recovery as a measure of thrombus stability in control versus OVX mice. Data represent mean \pm SEM; $n = 8$

contribute to the atherogenic effects of low-dose E₂ in the present study because the observed trend to increased thrombus stability may point into this direction. However, future studies are needed to address the molecular pathways in detail.

In the past, the animal models have shown that E₂ can inhibit atherosclerosis and many molecular mechanisms how E₂ mediates vasoprotective effects have been elegantly identified such as reduction of oxidative stress or anti-inflammatory effects [1, 12, 14, 15, 19]. However, there have also been few animal studies that suggested adverse effects of E₂ on vascular function, e.g. Darblade et al. [8] reporting impaired endothelial function. In post-menopausal women administration of E₂ clearly failed to mediate protection from cardiovascular events [3, 13, 21, 23], and this was not predictable from the numerous reports on anti-atherosclerotic E₂ actions in experimental animals.

From the current results the question arises why pro-atherogenic effects of E₂ were detected in this experimental setting. Previous studies used other protocols and mostly much higher doses of E₂ (3–28 μ g E₂/day) [5, 10]. From the present experiments it is also certain that the dose made a difference, because we found strong inhibitory effects of E₂ as well, if E₂ was administered at a sixfold higher dose (6.6 μ g/day). These high doses are, however, not relevant for translation into the clinical situation where the lowest possible concentrations are used for HRT in order to

minimize adverse effects on the thrombotic risk and hormone-dependent malignancies. High doses of estrogen (exceeding the physiological range several fold) alone or in combination with progestins are not longer used.

Furthermore, we chose to start the E₂ treatment in adult mice 2 weeks after ovariectomy, which can be considered as an experimental menopause, and we chose to accelerate the development of atherosclerosis by feeding a high-fat, high-cholesterol Western diet for 13 weeks. These experimental conditions share some features which are the basis of the timing hypothesis [4]. The timing hypothesis proposes that the detrimental effects of HRT in elderly women are dependent on a missed window of opportunity during which estrogens may have had beneficial effects. In fact, women after menopause with preexisting atherosclerosis and high risk of coronary heart disease experience an increased risk of adverse cardiovascular effects in response to HRT [13, 21].

Taken together, the assumption that low-dose estrogens protect against coronary heart disease has been challenged in large clinical trials [3, 13, 21]. From these studies it was concluded that HRT not only failed to be protective against coronary heart disease but even worsens cardiovascular outcomes and the risk of stroke. In consequence, long-term HRT is not anymore recommended. In the light of the clinical findings, the present study employing lower E₂ doses in a model of accelerated atherosclerosis might resemble more closely the clinical findings and may be useful in the future to investigate mechanistic aspects of adverse estrogen effects on progression of atherosclerosis. Therefore, the main value of the present study is that for the first time an experimental mouse model is presented that allows studying detrimental effects of E₂ on atherosclerosis and endothelial function. This model could, for example, be used to study the effects on atherosclerosis of different progestins in combination with E₂ or of other combination treatments aiming to oppose the detrimental effects of HRT.

Acknowledgment Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte.

References

1. Abbas A, Fadel PJ, Wang Z, Arbique D, Jialal I, Vongpatanasin W (2004) Contrasting effects of oral versus transdermal estrogen on serum amyloid A (SAA) and high-density lipoprotein-SAA in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:e164–e167
2. Al-Azzawi F (2002) Pulsed estrogen therapy: from cellular mode of action to tissue effects. *Climacteric* 5(suppl 2):27–31
3. Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H, Bonds D, Brunner R, Brzyski R, Caan B, Chlebowski R, Curb D, Gass M, Hays J, Heiss G, Hendrix S, Howard BV, Hsia J, Hubbell A, Jackson R, Johnson KC, Judd H, Kotchen JM, Kuller L, LaCroix AZ, Lane D, Langer RD, Lasser N, Lewis CE, Manson J, Margolis K, Ockene J, O'Sullivan MJ, Phillips L, Prentice RL, Ritenbaugh C, Robbins J, Rossouw JE, Sarto G, Stefanick ML, Van Horn L, Wactawski-Wende J, Wallace R, Wassertheil-Smoller S (2004) Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 291:1701–1712
4. Barrett-Connor E (2007) Hormones and heart disease in women: the timing hypothesis. *Am J Epidemiol* 166:506–510
5. Bourassa PA, Milos PM, Gaynor BJ, Breslow JL, Aiello RJ (1996) Estrogen reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10022–10027
6. d'Uscio LV, Smith LA, Katusic ZS (2001) Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxations in common carotid arteries of apolipoprotein e-deficient mice. *Stroke* 32:2658–2664
7. Dai G, Freudenberg T, Zipper P, Melchior A, Grether-Beck S, Rabausch B, de Groot J, Twarock S, Hanenberg H, Homey B, Krutmann J, Reifemberger J, Fischer JW (2007) Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases. *Am J Pathol* 171:1451–1461
8. Darblade B, Pendaries C, Krust A, Dupont S, Fouque MJ, Rami J, Chambon P, Bayard F, Arnal JF (2002) Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. *Circ Res* 90:413–419
9. Elhage R, Arnal JF, Pieraggi MT, Duverger N, Fievet C, Faye JC, Bayard F (1997) 17 beta-estradiol prevents fatty streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2679–2684
10. Elhage R, Maret A, Pieraggi MT, Thiers JC, Arnal JF, Bayard F (1998) Differential effects of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein on fatty-streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 97:242–244
11. Grodstein F, Stampfer M (1995) The epidemiology of coronary heart disease and estrogen replacement in postmenopausal women. *Prog Cardiovasc Dis* 38:199–210
12. Hermenegildo C, Oviedo PJ, Laguna A, Garcia-Perez MA, Tarin JJ, Cano A (2008) Transdermal estradiol reduces F2alpha-isoprostanol levels in postmenopausal women. *Menopause* 15:714–717
13. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E (1998) Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* 280:605–613
14. Koh KK, Son JW, Ahn JY, Lee SK, Hwang HY, Kim DS, Jin DK, Ahn TH, Shin EK (2001) Effect of hormone replacement therapy on nitric oxide bioactivity and monocyte chemoattractant protein-1 levels. *Int J Cardiol* 81:43–50
15. Lam KK, Lee YM, Hsiao G, Chen SY, Yen MH (2006) Estrogen therapy replenishes vascular tetrahydrobiopterin and reduces oxidative stress in ovariectomized rats. *Menopause* 13:294–302
16. Mendelsohn ME, Karas RH (1999) The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 340:1801–1811
17. Mikkola TS, Clarkson TB (2002) Estrogen replacement therapy, atherosclerosis, and vascular function. *Cardiovasc Res* 53:605–619
18. Montague CR, Hunter MG, Gavrilin MA, Phillips GS, Goldschmidt-Clermont PJ, Marsh CB (2006) Activation of estrogen receptor-alpha reduces aortic smooth muscle differentiation. *Circ Res* 99:477–484

19. Pervin S, Singh R, Rosenfeld ME, Navab M, Chaudhuri G, Nathan L (1998) Estradiol suppresses MCP-1 expression in vivo: implications for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1575–1582
20. Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801–809
21. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288:321–333
22. Suvorava T, Lauer N, Kumpf S, Jacob R, Meyer W, Kojda G (2005) Endogenous vascular hydrogen peroxide regulates arteriolar tension in vivo. *Circulation* 112:2487–2495
23. Vickers MR, MacLennan AH, Lawton B, Ford D, Martin J, Meredith SK, DeStavola BL, Rose S, Dowell A, Wilkes HC, Darbyshire JH, Meade TW (2007) Main morbidities recorded in the women's international study of long duration oestrogen after menopause (WISDOM): a randomised controlled trial of hormone replacement therapy in postmenopausal women. *BMJ* 335:239
24. Wassmann S, Czech T, van Eickels M, Fleming I, Bohm M, Nickenig G (2004) Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice. *Circulation* 110:3062–3067
25. Wilson KM, Lynch CM, Faraci FM, Lentz SR (2003) Effect of mechanical ventilation on carotid artery thrombosis induced by photochemical injury in mice. *J Thromb Haemost* 1:2669–2674
26. Yoshida T, Gan Q, Shang Y, Owens GK (2007) Platelet-derived growth factor-BB represses smooth muscle cell marker genes via changes in binding of MKL factors and histone deacetylases to their promoters. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C886–895

12. Lebenslauf

Lebenslauf

Zur Person:

Till Freudenberger

Diplom-Biologe

geboren am 13. März 1981 in Düsseldorf

ledig

Zur Familie:

Eltern:

Michael Freudenberger,
Studiendirektor,
geboren am 07. Oktober 1949

Monika Bender-Freudenberger, geb. Bender,
Volljuristin,
geboren am 03. Februar 1953

Geschwister:

2 Schwestern im Alter von 22 und 25 Jahren

Berufspraxis

Sommer 2006 bis

Oktober 2008: wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie & Klinische Pharmakologie der Universität Düsseldorf mit dem Ziel der Promotion zum Dr. rer. nat. (Hauptgebiet: *in vivo* Pharmakologie)

seit Oktober 2008: wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie des Universitätsklinikums Essen mit dem Ziel der Promotion zum Dr. rer. nat. (Hauptgebiet: *in vivo* Pharmakologie)

Studium

Studienzeit: Oktober 2001 bis Sommer 2006

Hochschule: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Studiengang: Diplombiologie

Schwerpunkt: Im Hauptstudium wurde der Schwerpunkt auf die Erlernung molekularbiologischer Techniken gelegt

Diplomarbeit: Forschungszentrum Jülich, Abteilung: IBI-2
Thema: „Expression, Reinigung und strukturelle Charakterisierung des X1-Proteins aus dem SARS-Coronavirus“

Diplom: mit Auszeichnung bestanden

Zivildienst

Dienstzeit: 03. Juli 2000 bis 31. Mai 2001

Dienststelle: Johanniter-Unfall-Hilfe e.V.
RV Rhein/Ruhr
Erkrather Strasse 245
40233 Düsseldorf

Qualifikation: Ausbildung zum Rettungshelfer an der staatlich anerkannten Schule für den Rettungsdienst „Johanniterschule Münster“

Schulausbildung

Grundschule: 1987 – 1991 Grundschule Einsiedelstraße in Düsseldorf

Gymnasium: 1991 – 2000 Annette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasium in Düsseldorf

Praktikum: Rechtsanwaltskanzlei Dr. Lindenau, Prior & Partner

Schulabschluss: Abitur (Note: 1,4)

Prüfungsfächer: Biologie, Englisch, Geschichte, Mathematik

Sprachkenntnisse

Englisch: in Wort und Schrift (fließend) mit Absolvierung des APIEL

Französisch: gute Sprachkenntnisse

Latein: Latinum, früher: Großes Latinum

Weitere Tätigkeiten

- von 1999 bis 2001: samstägliche Arbeit im Betrieb meines Großvaters „Spedition und Kranverleih JOSEF BENDER“ zur Finanzierung persönlicher Hobbys; Aussetzen während des Zivildienstes; Wiederaufnahme der Arbeit nach dem Zivildienst in Form von Aushilfstätigkeiten je nach Bedarf
- 2002: zur Finanzierung des Studiums Aushilfstätigkeit in Jacques` Weindepot in Hilden, 1 x wöchentlich und zur Finanzierung des Studiums tägliche Arbeit bei „Peter Zinn - Tennisplatzservice“ in den Semesterferien
- 2004: zur Finanzierung des Studiums tägliche Arbeit im „Garten- und Landschaftsbau - Stefan Krömer“ in praktikumsfreier Zeit
05. September 2005
bis 26. Mai 2006: studentische Hilfskraft

Engagement und Freizeitgestaltung

- Sportliche Interessen: seit dem 6. Lebensjahr als aktiver Leichtathlet im TBH (Turnerbund Hassels) tätig; seit 1999 Zehnkampf und Sprint (Qualifikation zur Teilnahme an den Westdeutschen Meisterschaften); Erwerb der C-Trainer-Lizenz;
bis Ende 2008: Leitung einer Sportgruppe für Jugendliche ab 14 Jahren

Essen, den 16. April 2010

13. Eidesstattliche Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Mechanistische Untersuchungen zum Einfluss von Estrogenen und Gestagenen auf die Atherothrombose“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Till Freudenberger befürworte.

Essen, den _____

(Prof. Dr. Jens W. Fischer)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

(Till Freudenberger)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

(Till Freudenberger)